SYNTHESE VON RINDERINSULINFRAGMENTEN NACH DER LIQUID-PHASE-METHODE UNTER EINSATZ PHOTOLABILER ANKERVERBINDUNGEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Werner Stüber
aus Heidenheim

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SYNTHESE VON RINDERINSULINFRAGMENTEN NACH DER LIQUID-PHASE-METHODE UNTER EINSATZ PHOTOLABILER ANKERVERBINDUNGEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Werner Stüber
aus Heidenheim

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	16. September 1983
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Voelter

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Ernst Bayer in der Zeit von Mai 1981 bis Mai 1983 am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Ernst Bayer, danke ich für die Stellung des Themas, seine großzügige Unterstützung und das rege Interesse an meiner Arbeit.

Für Monika

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547612_0044

A B S T R A C T

Stüber, Werner:

SYNTHESE VON RINDERINSULINFRAGMENTEN NACH DER LIQUID-PHASE-METHODE UNTER EINSATZ PHOTOLABILER ANKERVERBINDUNGEN

Es werden die Synthesen von BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylestern beschrieben. Diese Verbindungen werden mit Glycylpoly(oxyethylen) der Molmasse 6000 und 15000 gekuppelt. Dadurch kann die C-terminale Aminosäure der Peptidsequenz quantitativ an der Trägersubstanz fixiert werden. Mit diesen Trägern werden Peptidsynthesen auf dem Gebiet der Rinderinsulin-B-Kette durchgeführt.

Die Peptide werden durch Kupplung von Einzelbausteinen zum N-terminalen Ende hin aufgebaut, die Abspaltung vom Polymer erfolgt durch Photolyse.
So kann das geschützte, C-terminale Nona- und Undekapeptid der Rinderinsulin-B-Kette isoliert werden. Mit Fluorwasserstoff werden die Schutzgruppen der Drittfunktionen entfernt und die Peptide an Ionenaustauschsäulen rein erhalten. Dabei lassen sich Rumpf- und Fehlsequenzen erfassen. Es kann gezeigt werden, daß besonders Probleme beim Einsatz von BOC-Arg(Mbs)-OH auftreten.

Das C-terminale Dokosapeptid der Rinderinsulin-B-Kette wird durch eine Fragmentkupplung von BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH mit dem polymergebundenen Nonadekapeptid aufgebaut.
Dieses Peptid kann photolytisch abgespalten und isoliert werden.

Die polymergebundene Rinderinsulin-B-Kette wird durch stufenweisen Aufbau hergestellt. Dabei treten Schwierigkeiten bei den Kupplungen der Sequenz Asn-Gln-His auf. Die photolytische Abspaltung des Triakontapeptids läßt sich durchführen, eine Reinigung nach der Schutzgruppenabspaltung kann aber aufgrund der schlechten Kupplungsumsätze nicht erreicht werden.

UNIV. LEIDEN BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	ALLGEMEINER TEIL	1
1.	Zielsetzungen und Methoden der chemischen Peptidsynthesen	1
1.1.	Die klassische Synthese	4
1.1.1.	Fragmentkondensation	4
1.1.2.	Der stufenweise Aufbau	4
1.1.3.	Die Polymer-Reagens-Peptidsynthese	5
1.2.	Die Merrifield-Methode	5
1.3.	Die Synthese an löslichen Trägern	7
1.3.1.	Der lösliche Polystyrolträger	7
1.3.2.	Die Liquid-Phase-Methode	7
2.	Problemstellung	10
3.	Insulin, Allgemeines	12
4.	Aufbau der Peptide an Poly(oxyethylen)	15
4.1.	Vorbereitung des Polymers	15
4.2.	Einführung der 4-[N-(tert.-Butyloxy-carbonyl)aminoacyloxymethyl]-3-nitrobenzoe-säure	19
4.3.	Umsetzung mit polymeren Trägern	33
4.4.	Diskussion	34
4.5.	Synthesezyklus der Liquid-Phase-Methode	35
4.6.	Die Wahl der Schutzgruppen und Kupplungs-methoden	37
4.7.	Beobachtungen zum Aufbau der Insulin-B-Kette	39

5.	Abspaltung durch Photolyse	43
5.1.	Der Einsatz photolabiler Gruppen	43
5.2.	Photolyse des geschützten Nonapeptidpolymers	44
5.3.	Charakterisierung des Nonapeptids	45
5.4.	Photolyse des Undekapeptids	47
5.5.	Charakterisierung des Undekapeptids	48
5.6.	Photolyse des Dokosapeptids	50
5.7.	Photolyse der polymergebundenen Insulin-B-Kette	55
5.8.	Diskussion	56
II.	EXPERIMENTELLER TEIL	58
1.	Abkürzungen, allgemeine Arbeitsvorschriften, Geräte und Chemikalien	58
1.1.	Abkürzungen	58
1.2.	Allgemeine Arbeitsvorschriften	59
1.3.	Geräte und Instrumente	60
1.4.	Chemikalien, Lösungsmittel und Reagentien	60
2.	Herstellung der Ausgangsverbindungen	63
2.1.	Darstellung der Aminosäurederivate	63
2.2.	L-Leucinmethylesterhydrochlorid	63
2.3.	BOC-His(Trt)-OH	64
2.4.	BOC-Arg(Mbs)-OH	65
3.	Darstellung der 4-[N-(tert.-Butyloxy-carbonyl)aminoacyloxymethyl]-3-nitrobenzoe-säuren	66

4.	Synthese des Rinderinsulinfragments B_{22-30}	75
4.1.	Vorbereitung des Polymers zum Peptidaufbau	75
4.1.1.	Veresterung von POE_{15000} mit BOC-Gly	75
4.1.2.	Einführung der C-terminalen Aminosäure	75
4.2.	Aufbau des Nonapeptids	76
4.3.	Abspaltung des geschützten Nonapeptids	79
4.4.	Reinigung des geschützten Peptids	79
4.5.	Schutzgruppenabspaltung mit HF	81
4.6.	Reinigung des Nonapeptids	82
4.7.	Reinheitskontrollen und physikalische Eigenschaften	83
5.	Synthese des Rinderinsulinfragments B_{20-30}	85
5.1.	Aufbau des Undekapeptids am löslichen Träger	85
5.2.	Abspaltung des geschützten Undekapeptids	85
5.3.	Reinigung des geschützten Undekapeptids	86
5.4.	Schutzgruppenabspaltung mit HF	87
5.5.	Reinigung des Undekapeptids	87
5.6.	Optimierung der Reinheit vom geschützten Undekapeptid	89
5.7.	Schutzgruppenabspaltung mit HF	90
5.8.	Reinheitskontrollen und physikalische Eigenschaften	92
6.	Synthese des Rinderinsulinfragments B_{9-30}	93
6.1.	Aufbau des vollgeschützten Dokosapeptids	93
6.2.	Fragmentkupplung am löslichen Träger	94
6.3.	Abspaltung des geschützten Dokosapeptids	102

6.4.	Reinigung des geschützten Dokosapeptids	103
6.5.	Zusammenfassung der chemischen und physikalischen Daten	108
7.	Synthese der Rinderinsulin-B-Kette	109
7.1.	Aufbau des Triakontapeptids	109
7.2.	Abspaltung des geschützten Peptids	111
7.3.	Schutzgruppenabspaltung	113
8.	Synthese des Insulinfragments B_{9-11} am löslichen Träger	114
8.1.	BOC-Leu-Polymer	114
8.2.	Kupplung mit BOC-His(Trt)-OH	114
8.3.	Kupplung mit BOC-Ser(Bzl)-OH	115
8.4.	Photolyse des Tripeptidpolymers	116
III.	ZUSAMMENFASSUNG	118
IV.	LITERATURVERZEICHNIS	120

I. ALLGEMEINER TEIL

1. Zielsetzungen und Methoden der chemischen Peptidsynthesen

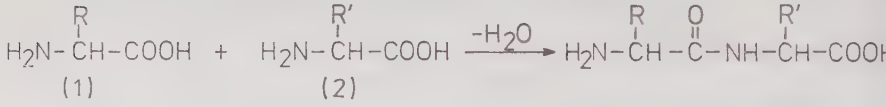
Peptide und Proteine nehmen in der Biochemie eine entscheidende Stellung ein. Eine große Anzahl von Hormonen, Enzymen und Antibiotica sind aus diesen Bausteinen aufgebaut. Seit der Prägung des Ausdrucks "Peptid" und den ersten Synthesen durch E. Fischer (1) hat die Peptidchemie zunehmend die Aufmerksamkeit der Chemiker auf sich gelenkt.

Das Interesse an der Synthese von Peptiden läßt sich durch folgende Argumente stützen:

- Durch den Identitätsvergleich zwischen synthetischen und natürlichen Peptiden werden fehlerhafte Sequenzanalysen erkannt.
- Durch die Darstellung synthetischer Peptide lassen sich Studien über Struktur und Aktivität analoger Peptidsequenzen erstellen. Dies kann beispielsweise durch den Ersatz einzelner Aminosäuren in biologisch aktiven Peptiden durchgeführt werden.
- Es lassen sich auf chemischem Weg biologisch und therapeutisch anwendbare Präparate darstellen. Durch gezielte Modifikation einzelner Strukturbausteine kann eine Wirkungssteigerung im Vergleich zum natürlichen auftretenden Vorbild erzielt werden.

Von M. Bergmann und L. Zervas wurde im Jahr 1932 (2) durch die Einführung der Benzyloxycarbonylschutzgruppe die Peptidchemie auf eine neue Basis gestellt: durch den wirkungsvollen und reversiblen Schutz der Aminofunktion kann eine Peptidsynthese systematisch durchgeführt werden. Die grundlegende chemische Reaktion eines Peptidaufbaus ist die

Acylierung einer Aminosäure mit einer anderen Aminosäure:



Um diesen Reaktionsschritt eindeutig durchzuführen, müssen die folgenden Punkte beachtet werden:

- Die Carboxylfunktion der Aminosäure (1) muß in einen kupplungsfähigen Zustand gebracht werden. Die Aminofunktion muß wirksam geschützt sein.
- Eine Razemisierung der Aminosäuren muß vermieden werden.

Die hierbei auftretenden, grundlegenden Probleme führten zur Entwicklung einer Vielzahl von Aminosäureschutzgruppen und Kupplungsmethoden, deren Kombination als Strategie und Taktik einer Peptidsynthese bezeichnet wird. Einen Überblick hierzu geben mehrere Standardwerke (3-7).

Strategie von Peptidsynthesen

Es lassen sich hier drei bedeutende Strategien anführen (3):

- Die konventionelle Methode, die das Peptid durch Fragmente oder auch Einzelbausteine zur Gesamteinheit aufbaut. Hierbei werden Drittfunktionen weitestgehend zur Ausschaltung von Nebenprodukten geschützt.
- Eine ebenfalls konventionelle Methode, die sich aber durch eine geringstmögliche Maskierung von Drittfunktionen auszeichnet.
- Eine Synthese unter Einsatz polymerer Trägersubstanzen. Hierzu zählen die "Festphasen-Methode" und die "Flüssigphasen-Methode". Der Peptidaufbau kann stufenweise durch Einzelbausteine oder durch Fragmentkupplungen erfolgen.

Taktik der Peptidsynthese

Die Synthesetaktik, man versteht darunter die Wahl der Schutzgruppen und Kupplungsmethoden, orientiert sich entscheidend nach der Synthesestrategie.

Schutzgruppentechnik

Schutzgruppen haben die Aufgabe, an dem Reaktionsschritt nicht beteiligte Gruppen zu schützen, damit die Kupplungsreaktion zu einem definierten Produkt führt. Man unterscheidet zwei Arten von Schutzgruppen:

- solche, die während der Peptidverknüpfung zum Schutz der nichtbeteiligten Aminofunktion bzw. Carboxylfunktion eingesetzt sind und danach zur Kettenverlängerung entfernt werden;
- solche, die erst am Ende der Peptidsynthese entfernt werden und während der Aufbaureaktionen alle reaktionsfähigen Drittfunktionen schützen.

Kupplungstechnik

Zur Knüpfung einer Peptidbindung muß die Carboxylgruppe einer Aminosäure voraktiviert, das bedeutet, in einen kupplungsfähigen Zustand überführt werden. Herausragende Forderungen an die Verknüpfungsmethode sind hohe Umsatzgrade bei vernünftigen Reaktionszeiten, sowie der razemisierungsfreie Ablauf der Reaktion. Als besonders leistungsfähig haben sich hier die DCCI-Methode (8), die Verwendung gemischter Anhydride (9-13) und aktivierter Ester (5,14), sowie die Azid-Methode (15) erwiesen.

1.1. Die klassische Synthese

1.1.1. Fragmentkondensation

Bei dieser Methode werden Peptidfragmente synthetisiert, die nach vollständiger Reinigung zum gesamten Peptid gekuppelt werden. Für die Kupplung kommen hier meist aktivierte Ester bzw. die Azid-Methode in Betracht. Die Synthesen mit dieser Methode sind zwar meist sehr zuverlässig, werden aber durch die Reinigungsschritte sämtlicher Fragmente kostspielig und zeitraubend. Aufgrund nicht quantitativer Umsätze bei den Verknüpfungsschritten resultieren häufig schlechte Ausbeuten an Endprodukt. Weitere Schwierigkeiten treten oft durch die schlechte Löslichkeit bestimmter Peptidsequenzen auf. Dennoch wurden nach dieser Methode biologisch aktive Peptide mit bis zu hundert Aminosäurebausteinen dargestellt (7,16).

1.1.2. Der stufenweise Aufbau

Bei dieser klassischen Methode, die von Bodanszky (6) eingeführt wurde, wird das Peptid stufenweise durch Kupplung von Einzelbausteinen aufgebaut. Die Synthese beginnt am C-terminalen Ende der Peptidsequenz, wobei hohe Umsatzgrade durch den Einsatz von überschüssiger Carboxylkomponente erzwungen werden sollen. Nach dem Kupplungsschritt müssen die Zwischenstufen durch einen geeigneten Reinigungsprozeß, z.B. Säulenchromatographie, gereinigt werden. Als Schwierigkeiten können bei zunehmender Kettenlänge sequenzabhängige Löslichkeitsprobleme auftreten. Nach dieser Methode wurden bislang einige kleinere und mittlere Peptide synthetisiert, wobei auch eine erfolgreiche Secretinsynthese zu erwähnen ist (17-19).

1.1.3. Die Polymer-Reagens-Peptidsynthese

Bei dieser Synthesevariante handelt es sich nicht um eine Synthese am polymeren Träger, da sich die wachsende Peptidkette ständig in Lösung befindet. Hierbei werden unlösliche, polymer-aktivierte Carboxy-Derivate mit Aminokomponenten zur Reaktion gebracht, wobei das Polymer freigesetzt wird und das lösliche, geschützte Peptid entsteht. Vorteilhaft ist, daß die polymeren Reagenzien in einem hohen Überschuß eingesetzt werden können, und die Abtrennung des Peptids problemlos erfolgen kann. Mit zunehmender Kettenlänge werden die Kupplungsausbeuten durch sterische Einflüsse vermindert, und ebenso treten Schwierigkeiten bezüglich der Löslichkeit der geschützten Peptide auf. Es wurden dennoch einige Peptide erfolgreich nach dieser Methode hergestellt (20-22).

1.2. Die Merrifield-Methode

Die Probleme, die bei der klassischen Strategie auftreten, wollte R.B. Merrifield durch ein neuartiges Konzept lösen (23). Das prinzipiell Neue an dieser Methode besteht darin, alle mühsamen Reinigungsschritte, den großen Zeitaufwand und die Löslichkeitsprobleme zu umgehen. Im ersten Reaktionsschritt wird die C-terminale Aminosäure über eine Benzylesterbindung an ein unlösliches, vernetztes Polystyrolharz gebunden. Es erfolgt der stufenweise Aufbau zum Peptid. Als sehr vorteilhaft erweist sich, daß die im Überschuß eingesetzten Kupplungskomponenten durch Filtration einfach entfernt werden können. Durch große Überschüsse erhält man kurze Reaktionszeiten und hohe Kupplungsausbeuten.

Am Ende der Synthese läßt sich das Peptid acidolytisch abspalten, wobei jedoch nicht immer befriedigende Ergebnisse erzielt werden (24-26). Zur Verbesserung der Peptidabspaltung

lassen sich zwischen dem Trägerharz und der Peptidkette photolabile Ankerverbindungen einbauen. Die erfolgreiche Abspaltung geschützter Peptide wurde mit 3-Nitro-4-brom-methylbenzoesäureverbindungen (27) und mit α-Methyl-phenacylesterverbindungen (28) durchgeführt.

Die Nachteile der Merrifield-Methode sind das Entstehen von Rumpf- und Fehlsequenzen (29,30), die durch unvollständige Kupplungen und Schutzgruppenabspaltungen auftreten können. Eine wirkungsvolle Reinigung der so isolierten Peptide ist dann nur noch schwer oder gar nicht mehr durchführbar.

Aufgrund der Eigenschaften der eingesetzten Harze und der sich ständig wiederholenden Arbeitsgänge bot sich eine Automatisierung dieser Peptidsynthese an.
So wurde eine Vielzahl an Publikationen, die die Synthese biologisch interessanter Peptide beschreiben, bekannt:

Insulin (21/30 Aminosäuren) (31)
Ribonuclease A (124 Aminosäuren) (32)
Ferredoxin (55 Aminosäuren) (3)
Secretin (27 Aminosäuren) (34)
menschliches Wachstumshormon (188 Aminosäuren) (35)
Glucagon (29 Aminosäuren) (36)

Obwohl Peptide bis zu einer Größe von 188 Aminosäuren beschrieben wurden, mußten häufig diese Ergebnisse aufgrund von Fehlinterpretation widerrufen werden (5). Die Synthese von derartig großen Proteinen nach der Merrifield-Methode wird heute den hohen Anforderungen einer geglückten Chemosynthese noch nicht gerecht. Das Hauptzielgebiet der Merrifieldsynthese sind mittlere Peptide in einer Größenordnung von 10-15 Aminosäuren (5).

Eine strategische Variante zur Merrifieldsynthese bietet Letsinger (37) an, bei der die Peptidkette an einem poly-

meren Träger durch N-terminalen Aufbau synthetisiert wird. Der N-terminale Startaminosäureester wird an einen polymeren Chlorkohlensäurebenzylester gebunden. Die Esterbindung wird nun verseift, die resultierende Carboxylfunktion nach der Anhydridmethode aktiviert, und daraufhin die nächste Aminosäure gekuppelt.
Ab der Dipeptidstufe treten hier Razemisierungsprobleme auf, die durch eine besondere Auswahl der Taktik gelöst werden müssen. Hierzu zählen die Wahl eines geeigneten Carboxylschutzes sowie einer geeigneten Aktivierungsmethode. Obwohl hierzu sehr hilfreiche Entwicklungen zur Verfügung gestellt wurden, konnte sich diese Methode bislang nicht durchsetzen.

1.3. Die Synthese an löslichen Trägern

1.3.1. Der lösliche Polystyrolträger

Die Verwendung eines löslichen Trägers zur Vermeidung der Diffusionsprobleme und der sterischen Probleme, die bei den Merrifieldharzen auftreten, wurde von Shemyakin et al. (38) vorgeschlagen. Als Trägermaterial wurde polyfunktionelles, unvernetztes Polystyrol benutzt, sodaß die Kupplungsschritte in Lösung durchgeführt werden konnten. Wie sich aber aus chemischen und kinetischen Daten ergab (39), zeigen die Reaktionen am Polystyrol ein heterogenes Reaktionsverhalten. Die Umsetzungen verliefen kinetisch nicht einheitlich, was durch sterische Effekte begründet wurde. Ein weiterer Nachteil war die Bildung von Einschlüssen, so daß niedermolekulare Verunreinigungen nach dem Kupplungsschritt durch Umfällen nicht quantitativ entfernt werden konnten.

1.3.2. Die Liquid-Phase-Methode

Durch die von E. Bayer und M. Mutter entwickelte Liquid-Phase-Methode (40,41) werden die Nachteile der Synthese am

löslichen Polystyrolträger entscheidend verbessert. Diese Methode vereinigt die Vorteile der Merrifieldsynthese mit der klassischen Synthese. Als polymerer Träger kommt Poly(oxyethylen) (POE), dessen Molmasse je nach Anforderung 3 000-20 000 beträgt, zum Einsatz. POE ist gut löslich in Wasser, Methylenchlorid, Dimethylformamid, warmem Methanol, Dimethylsulfoxid und Hexamethylphosphorsäuretriamid, d.h. in den für die Peptidsynthese relevanten Lösungsmitteln. Die Aufbautaktik der Peptide erfolgt zum N-terminalen Ende hin, wobei die einzelnen Kupplungsreaktionen wie bei der klassischen Peptidsynthese in Lösung durchgeführt werden. Niedermolekulare Stoffe wurden nach der Umsetzung durch Ultrafiltration in wässrigem Medium entfernt (40,41). Diese Reinigungsoperation wurde durch die Einführung der Kristallisationsmethode wesentlich vereinfacht (42).

Das gelöste Polymer wird hierbei durch Zutropfen von Diethylether quantitativ ausgefällt, wobei eine Neigung zu Einschlüssen nicht besteht (43-47). Dadurch ist es möglich, einen raschen und quantitativen Umsatz durch den Einsatz überschüssiger Kupplungskomponente zu erzwingen. Die Reaktionsgeschwindigkeit liegt dabei in der Größenordnung einfacher aliphatischer Aminosäureester (48). Die Reaktion kann sehr einfach mit dem Fluramtest quantitativ verfolgt werden (49,50). Da der Peptidaufbau stufenweise ohne Zwischenreinigung nach Standardbedingungen durchführbar ist, wird bereits mehrfach über eine Automatisierung berichtet (51-53). Das geschützte Peptid kann vom polymeren Träger durch Umesterung, Ammonolyse, Hydrazinolyse und alkalische Verseifung abgespalten werden. Die Behandlung des polymeren Peptidylesters mit wässriger Natriumhydroxidlösung birgt die Gefahr von Nebenreaktionen in sich und ergibt bei längeren Peptiden oft geringe Ausbeuten (44,54). Um die Abspaltung des Peptids vom POE schonender zu gestalten, wurden zwischen dem Polymer und der Peptidkette nach Vorbild der Merrifieldharze Benzylestergruppen einge-

führt (55). Die Peptidbenzylesterbindung kann durch wasserfreie Säuren, wie Fluorwasserstoff und HBr/TFA (45,47), durch Hydrogenolyse (45,47), sowie durch alkalische Verseifung gespalten werden (56). Dieser Abspaltungsweg ist bei größeren Peptiden, z.B. der Insulin-B-Kette, nicht mehr gangbar (47). Als Alternative bietet sich hier eine photolabile Ankergruppierung an, die es gestattet, auf schonende Weise vollgeschützte Peptide zu erhalten. Die in der Merrifieldsynthese eingesetzten Ankerverbindungen lassen sich erfolgreich auf die Liquid-Phase-Peptidsynthese übertragen. Neben 3-Nitro-4-brommethylbenzoesäurederivaten (27,57-59) eignen sich auch 4-(2-Chlorpropionyl)phenylacetoxyderivate (60,61) des POE, um durch Bestrahlung geschützte Peptide in hohen Ausbeuten zu erhalten.

2. Problemstellung

Trotz der vielen Vorteile der Liquid-Phase-Methode gibt es beim Aufbau von Peptiden mit dieser Methode einige prinzipielle Probleme. So konnte die Abspaltung des aufgebauten, geschützten Peptids durch einen gezielten Einbau von Ankerverbindungen wesentlich verbessert werden. Besonders vielversprechende Ergebnisse lieferte der 4-Brommethyl-3-nitrobenzylanker mit seiner Brommethylfunktion als Bindeglied zwischen der C-terminalen Aminosäure und dem polymeren Träger. Als Polymer wird bevorzugt Gly-POE benützt, da durch die Aminofunktion rasche Kupplungsreaktionen mit symmetrischen Anhydriden durchführbar sind. Die direkte Veresterung von 4-Brommethyl-3-nitrobenzoesäure mit POE ergibt eine Beladung von lediglich 30 % (58), wogegen mit BOC-Gly Umsätze von ca. 90 % erhalten werden (62). Als Kernproblem stellt sich die Veresterung der geschützten C-terminalen Aminosäure mit dem polymergebundenen Anker. Sowohl die Methode der BOC-geschützten Aminosäurecäsiumsalze von B.F. Gisin (47,55,57,63), als auch die Methode organischer Basen, wie z.B. Triethylamin in DMF (64), bringen bei der polymeren Reaktion keinen zufriedenstellenden Beladungsgrad.

Wie bereits gezeigt werden konnte (65,66), kann Gly-POE durch eine Kupplung mit BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)-benzylestern quantitativ umgesetzt werden. Dadurch wird die Ankerverbindung samt der C-terminalen Aminosäure in einem Reaktionsschritt eingeführt.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun Wege erarbeitet werden, diese neue Substanzklasse für weitere C-terminale Aminosäuren zu erschließen, um damit hochbeladene, polymere Träger aufbauen zu können. Mit diesen polymeren Trägern werden Peptidsynthesen auf dem Gebiet der Insulin-B-Kette durchgeführt. Dieses Peptid eignet sich hierzu hervorragend,

da es abgesehen von seiner Größe auch eine hinreichende Anzahl komplizierter, trifunktioneller Aminosäuren enthält. Beim Aufbau der Insulin-B-Kette werden dann polymergebundene Peptide verschiedener Länge bezüglich der photolytischen Abspaltung untersucht, wobei Abspaltungsausbeuten, die Reinheit der Peptide und eventuelle Nebenprodukte analysiert werden.

3. Insulin, Allgemeines (67-70)

Das Insulin besteht aus zwei Ketten, der A-Kette (acidic-chain) und der B-Kette (basic-chain), die über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. In der A-Kette liegt eine weitere, intrachenare Disulfidbrücke vor. Die A-Kette besitzt 21 Aminosäuren und die B-Kette 30 Aminosäuren. Insulin wurde 1921 von Banting und Best entdeckt. Die Reindarstellung und Kristallisation gelang Abel 1926, während die endgültige Strukturaufklärung 1955 durch Sanger durchgeführt wurde.

Insulin wird industriell in großem Ausmaß aus Schweine- und Rinderpankreata gewonnen und zur Bekämpfung des Krankheitsbildes des Diabetes mellitus eingesetzt. Hierbei ist interessant, daß Insuline verschiedener Herkunft, obwohl sie unterschiedliche Aminosäuresequenzen zeigen, in den üblichen biologischen Tests etwa dieselbe Aktivität zeigen.

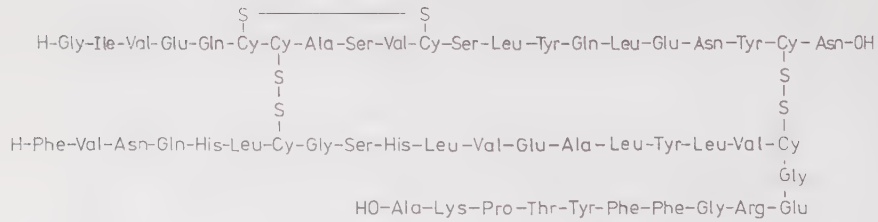


Abb. 1: Die Primärstruktur des Rinderinsulins

Die Unterschiede bezüglich der einzelnen Aminosäuren sind wie folgt:

Schweineinsulin:	A_{8-10}	Thr-Ser-Ile	
Humaninsulin	: A_{8-10}	Thr-Ser-Ile	
	B_{30}	Thr	.
Schafinsulin	: A_{8-10}	Ala-Gly-Val	

Die Biosynthese des Polypeptidhormons findet in den B-Zellen der Langerhansschen-Inseln im Pankreas statt. Das eigentliche Insulin bildet sich dabei aus dem Proinsulin, einer einkettigen Vorstufe (71). In Abb. 2 ist die Primärstruktur des Schweineproinsulins abgebildet.

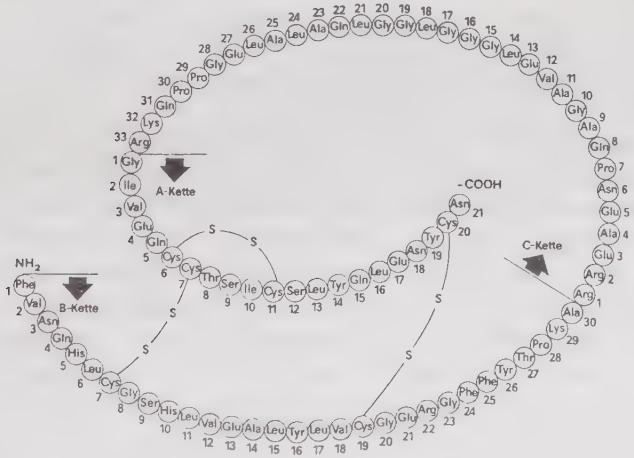


Abb. 2: Die Primärstruktur des Schweineproinsulins

Durch die C-Kette (connecting-peptide) werden die A-Kette und die B-Kette in eine optimale räumliche Anordnung gebracht, sodaß jetzt die Disulfidbrücken einheitlich geschlossen werden können. Die C-Ketten unterscheiden sich bezüglich ihrer Länge und der Sequenz je nach Herkunft

(Mensch 35 AS, Schwein 33 AS, Rind 30 AS). Nach der Disulfidbrückenbildung wird die C-Kette enzymatisch herausgespalten.

Insulinsynthesen

Neben dem rein wissenschaftlichen Interesse an Insulinsynthesen steht der große Bedarf an therapeutisch nutzbarem Material, das bisher aus Pankreata isoliert wird. Aus 1 kg Rinderpankreas erhält man etwa 75 mg Rohinsulin. Dieses muß, je nach Anforderung, durch mehrfache Rekristallisation, chromatographische Methoden und Gegenstromverteilung gereinigt werden. Dies erklärt den Nutzen einer auch in größerem Maßstab durchführbaren Totalsynthese.

Der getrennte Aufbau der A- und B-Kette und die anschließende Disulfidüberbrückung war der erste allgemein gangbare synthetische Weg zum Insulin. Durch die oxidative Rekombination erhält man ein Produkt mit einer biologischen Aktivität von 1-2 %. Bei dieser rein statistischen Reaktion entstehen 12 isomere Insuline, vier intramolekular verknüpfte A- und B-Ketten und eine Vielzahl an Polymeren. Das gewünschte Rekombinat kann durch Säulenchromatographie unter Rückgewinnung von nicht umgesetzten A- und B-Ketten rein isoliert werden (72,143). Durch Optimieren der Rekombinationsbedingungen läßt sich die Aktivität des Produktes auf 10 bis 20 % steigern (73).

Im Jahr 1963 beschreibt die Arbeitsgruppe von H. Zahn (74) die erste Totalsynthese beider Ketten und deren Rekombination. Die biologische Aktivität lag bei 1 %. Im Jahr 1964 veröffentlichte P.G. Katsoyannis (75), und im Jahr 1965 Wang (76) die Chemosynthese des Insulins. In der Folgezeit wurde wesentlich an der Verbesserung der Kettensynthesen sowie der Rekombination gearbeitet (69).

Durch Steiner (71) wurde die Funktion der C-Kette als wichtiger Baustein zur Kettenrekombination erkannt. Die Rekombination läßt sich hier mit 70 % Ausbeute durchführen. Das Humanproinsulin mit 86 Aminosäuren wurde von Yanaihara 1977 (77) und auch von Zahn (78) hergestellt. Eine derartige Synthese ist zwar wissenschaftlich sehr interessant, ist aber für eine technische Nutzung zu aufwendig.

Dagegen scheint der Gesamtaufbau des Insulins durch selektive Schwefelschutzgruppen, sowie durch eine Selektivitätsabstufung der N^{α}-Schutzgruppen leichter durchführbar zu sein (79-81).

Zur Insulinsynthese wird in jüngster Zeit die Gentechnologie herangezogen, wobei das Humaninsulin über das Humanproinsulin hergestellt wird (82-84).

4. Aufbau der Peptide an Poly(oxyethylen)

Um Peptide von der Größe der Insulin-B-Kette am POE aufzubauen, muß der solubilisierende Effekt des polymeren Trägers und damit die gute Löslichkeit der Gesamtverbindung bis zum Ende der Aufbaureaktionen gesichert sein. Zur Anwendung kommt hier deshalb ein POE der Molmasse 15000. Die relativ geringe Anzahl an funktionellen Gruppen eines solchen Trägermaterials setzt die quantitative Ausnutzung derselben zum Peptidaufbau voraus. Daher ist der Vorbereitung des Polymers zu den eigentlichen Aminosäurekupplungsreaktionen besondere Aufmerksamkeit zu widmen.

4.1. Vorbereitung des Polymers

Der polymere Träger kann zwar mit der Ankerverbindung, der 3-Nitro-4-brommethylbenzoesäure, direkt über eine Esterbindung verknüpft werden, der Acylierungsgrad beträgt aber

nur etwa 30 % (55,57), sodaß es sinnvoll ist, präparativ die Hydroxylgruppe des POE durch eine Aminofunktion zu ersetzen.
Der einfachste Weg hierzu führt über die Veresterung der Hydroxylgruppen mit BOC-Gly-anhydrid und einer anschließenden Schutzgruppenabspaltung. Die Veresterungsreaktion läßt sich in Gegenwart von 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator fast quantitativ durchführen (65), während die Umsatzgrade mit Pyridin häufig nur 80-85 % betragen.
In Abb. 3 ist das zugehörige Reaktionsschema dargestellt.

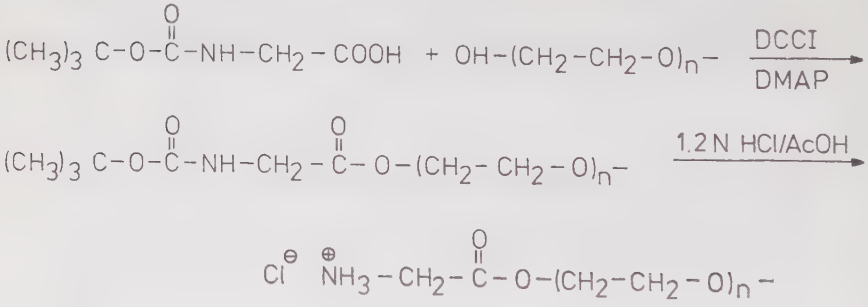
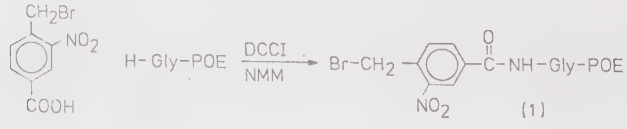


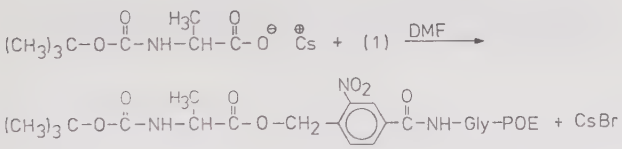
Abb. 3: Veresterung von POE mit BOC-Gly

Der photolabile Anker kann nach Entfernung der Aminoschutzgruppe nach der Methode der symmetrischen Anhydride quantitativ gekuppelt werden:



Der Umsatz mit den freien Aminofunktionen des Glycins kann sehr bequem mit dem Fluramtest verfolgt werden. Die Einführung der C-terminalen Aminosäure erfolgt über die Cäsiumsalze der BOC-geschützten Aminosäuren (63). Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich bei der Umsetzung einfacher, BOC-geschützter Aminosäuren mit brommethyliertem Benzoylglycyl-POE beschrieben (45). Beim Einsatz von Valin bzw. Threoninbenzylether waren die Beladungswerte aber nicht ermutigend (54,57).

Desweiteren wurde die Umsetzung von brommethyliertem Nitrobenzoylglycyl-POE mit dem Cäsiumsalz von BOC-Ala durchgeführt. Als Lösungsmittel wird bevorzugt DMF angewandt, da hier die Carboxylatgruppen der Aminosäure gut solvatisiert werden:



Da es keine Möglichkeit gibt, die Reaktion quantitativ zu verfolgen, muß nach Abbruch der Reaktion eine sehr saubere Aufarbeitung des Polymers erfolgen, weil der Beladungsgrad nur durch eine Aminosäureanalyse erfaßt werden kann. Glycin dient als innerer Standard, mit dem der Veresterungsgrad verglichen werden kann.

Nach der Veresterungsreaktion, sie dauert 1-5 Tage bei 50°C, erfolgt die über drei Stufen verlaufende Reinigungsoperation des Polymers. Erst daran anschließend kann eine aussagekräftige Aminosäureanalyse erstellt werden.

Die Aufarbeitung des Polymers umfaßt folgende Arbeiten:

a) Abtrennung des ausgefallenen Cäsiumbromids
b) dreimaliges Umfällen aus Methylenchlorid/Essigsäure/Ether
c) Umfällen aus Methanol/Ether

Durch das Umfällen in Gegenwart von Essigsäure soll eventuell noch vorhandenes BOC-Ala-Cäsiumsalz protoniert und damit entfernt werden. Dieser Reinigungsschritt darf nicht ausgelassen werden, da sonst zu hohe Alaninwerte vorgetäuscht werden.

Diese Reinigungsschritte sind nicht nur sehr zeitraubend, sondern auch noch mit dem Verlust von etwa 15 % Polymer verbunden. In Tab. 1 sind die Aminosäureanalysen von drei Umsetzungen mit BOC-Ala-Cäsiumsalz dargestellt.

Tab. 1: Aminosäureanalysen nach Veresterung mit BOC-Ala-Cäsiumsalz

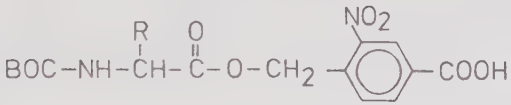
	Gly	Ala
Reaktion 1	1.00	0.48
Reaktion 2	1.00	0.15
Reaktion 3	1.00	0.58

Hierbei trat eine zunächst noch nicht interpretierbare Eigenheit auf: die Reaktion 1 lieferte eine Beladung von 48 %; um den Wert zu steigern, wurde nochmals frisches BOC-Ala-Cäsiumsalz hinzugefügt und sieben weitere Tage zur Reaktion gebracht. Die Aminosäureanalyse erbrachte jetzt nur noch 15 % Alanin (Reaktion 2). Offensichtlich wird der bereits vorhandene Ester durch die lang andauernde Reaktion wieder abgebaut.

Dieser Verdacht wurde durch die Untersuchungen bei den Reaktionen der monomeren Bausteine experimentell bestätigt.

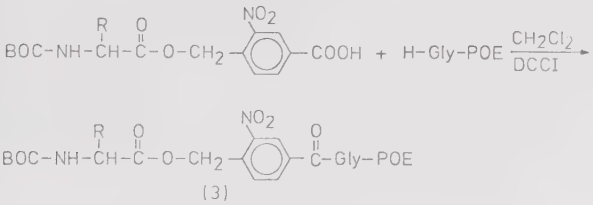
4.2. Einführung der 4-[N-(tert.-Butyloxycarbonyl)aminoacyloxymethyl]-3-nitrobenzoesäure

Um die C-terminale Aminosäure einer Peptidsequenz in höchstmöglichen Ausbeuten an den polymeren Träger zu knüpfen, muß das System der nucleophilen Bromsubstitution am Polymer durch eine prinzipiell neue Aufbautaktik ersetzt werden. Deshalb wurde der Versuche unternommen, Substanzen folgender Struktur zu synthetisieren:



(2)

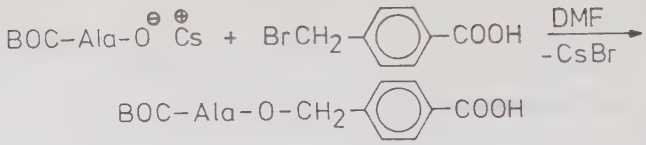
(2) kann jetzt mit H-Gly-POE nach der Methode der symmetrischen Anhydride oder der aktivierten Ester umgesetzt werden:



(3)

Die Fähigkeiten der Substanzklasse (2) (respektive ohne $-NO_2$-Gruppe) wurde bereits von I. Gatfield (55) erkannt. Gatfield versuchte den BOC-Alanin-(4-carboxy)benzylester

nach folgendem Prinzip aufzubauen:



Dieses Produkt läßt sich zwar darstellen, eine effektive Reinigung ist jedoch problematisch. Neben den Ausgangsverbindungen, die sehr schwer abtrennbar sind, treten noch Polymere aus der 4-Brommethylbenzoesäure hinzu. Analog verhält sich auch die Reaktion mit der nitrierten Säure.

Deshalb ist es erforderlich, die Synthese unter Zuhilfenahme einer Carboxylschutzgruppe durchzuführen. In Abb. 4 ist das Reaktionsschema dargestellt, mit dem die Reindarstellung der BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylester in guten Ausbeuten gelingt.

Bislang wurde die Umsetzung mit den folgenden Aminosäuren durchgeführt:

Gly, Ala, Val, Leu, Asn, Gln, Thr(Bzl), Glu(Bzl), Ser(Bzl)

Die in Abb. 4 dargestellten Reaktionsschritte lassen sich hierbei einfach und mit hohen Ausbeuten durchführen. Zur Einführung der tert.-Butylschutzgruppe wird die 3-Nitro-4-brommethylbenzoesäure unter Druck mit Isobuten umgesetzt. Der resultierende Ester kann nach Extraktion ohne weitere Reinigungsschritte eingesetzt werden. Die Umsetzung mit den BOC-Aminosäure-Cäsiumsalzen erfolgt bei 50°C im Lösungsmittel DMF. Bei der Entwicklung der Methode wurde der Reaktionsschritt (I) mit einer Reaktionszeit von rund 16 Stunden ausgeführt. Grundlage hierfür waren die von B.F. Gisin (63) ermittelten, experimentellen Daten bei der Reak-

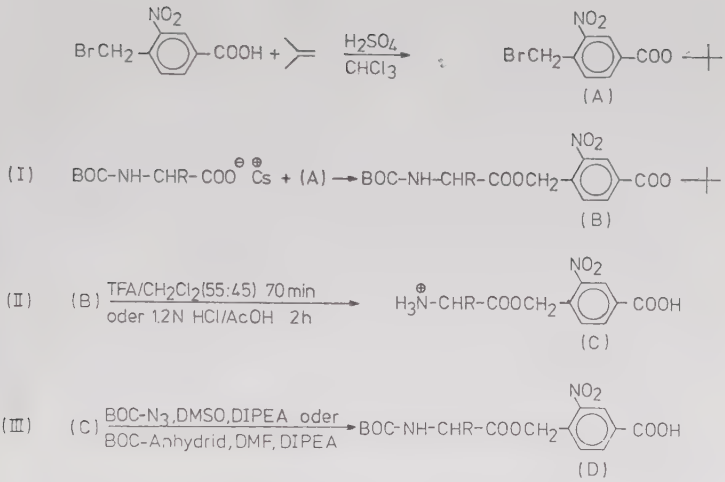


Abb. 4: Syntheseplan zur Darstellung der 4-[N-(tert.-Butyloxycarbonyl)aminoacyloxymethyl]-3-nitrobenzoesäure

tion chlormethylierter Polystyrole mit BOC-Aminosäure-Cäsiumsalzen. Das Produkt B (Ala) ließ sich auf diese Weise mit einer Ausbeute von 70 % herstellen. Unter denselben Reaktionsbedingungen konnten die entsprechenden Valin- und Threoninbenzyletherverbindungen nur in äußerst spärlichen Ausbeuten gewonnen werden. Aufgrund deren physikalischen Eigenschaften, sie stellen Öle dar, konnte eine Reinigung nur durch Säulenchromatographie durchgeführt werden.

Es läßt sich jedoch zeigen, daß die Umsetzung durch eine wesentliche Verkürzung der Reaktionszeiten optimiert werden kann. Beim Zusammenmischen der Reaktanten tritt eine

sehr intensive Rotfärbung auf, deren Abklingen gleichsam das Reaktionsende anzeigt. Wie sich mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie zeigen läßt, tritt hier das Maximum an gewünschtem Produkt auf. Gleichzeitig ist die Konzentration an Nebenprodukten minimal. Wird die Reaktion zu diesem Zeitpunkt nicht beendet, beginnt eine, von der jeweiligen Aminosäure abhängige, mehr oder weniger rasche Produktzersetzung. Dabei tritt eine Vielzahl an Nebenprodukten auf. Als optimale Reaktionszeiten sind abhängig von den individuellen Aminosäuren 20-60 Minuten anzusehen. Die Ausbeuten sind hierbei annähernd quantitativ, lediglich bei den kristallinen Estern treten Verluste beim Umkristallisieren auf. Nebenprodukte, die jedoch durch Umkristallisieren entfernt werden konnten, traten in größerem Maß nur bei den Aminosäuren Asn und Gln auf.

Die Reaktionszeiten sollten genau eingehalten werden, da ansonst Nebenprodukte entstehen, die von den häufig öligen Endprodukten nur sehr mühsam entfernt werden können. Die Produkte B werden, soweit sie als Öle erhalten werden, nur durch Extraktion gereinigt. Dadurch erhält man analytisch saubere Endprodukte.

Der Reaktionsschritt (I) gelingt auch bei Aminosäuren mit ungeschützter Amidfunktion. So wurde im Gegensatz zu der bislang vertretenen Ansicht (45) für die Aminosäure Asn mit 20 Minuten die überhaupt kürzeste Reaktionszeit gefunden.

Zur Abspaltung der BOC- und Säureschutzgruppe werden die Produkte B mit 1.2 N HCl/AcOH behandelt. Die Reaktionszeit beträgt hierbei 2 Stunden. Oftmals kristallisieren die Produkte C nach 1 Stunde aus der Reaktionslösung allmählich aus. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie läßt sich zeigen, daß die Stickstoffschutzgruppe nach 30 Minuten quantitativ abgespalten ist, wogegen die tert.-Butylestergruppe nach 2 Stunden noch zu etwa 10-20 % vorhanden ist. Im Normalfall wird nach 2 Stunden das Abspaltungsreagens

am Rotationsverdampfer abgezogen und Säurespuren werden durch Nachschleppen mit Methylenchlorid entfernt. Die Endprodukte liegen jetzt als gelb-weiße, kristalline Masse vor. Diese werden am besten in Aceton aufgeschlämmt und abgesaugt. Verluste können bei etwas acetonlöslichen Substanzen, wie z.B. H-Ser(Bzl)-(4-carboxy-2-nitro)benzylester, durch Petroletherzusätze verhindert werden. Dadurch erhält man dünnschichtchromatographisch saubere, scharf schmelzende und reinweiße Produkte. In Tab. 2 sind einige Daten der Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylester zusammengefaßt.

Tab. 2: Eigenschaften der Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)-benzylester

	R_F*	[°C] Zersetzungspkt.	Abspaltungsmethode
Ala	0.47	209-212	TFA/Methylenchlorid
Gly	0.46	218	HCl/AcOH
Val	0.44	229-230	TFA/Methylenchlorid
Leu	0.54	185-187	HCl/AcOH
Asn	0.42	**	HCl/AcOH
Gln	0.41	160.5	HCl/AcOH
Ser(Bzl)	0.59	187	HCl/AcOH
Thr(Bzl)	0.62	130	TFA/Methylenchlorid
Glu(Bzl)	0.64	196-198	HCl/AcOH

* Fließmittel: Butanol/Essigsäure/Wasser 3:1:1

** nicht bestimmt

Anstelle von 1.2 N HCl/AcOH kann zur Abspaltung der Schutzgruppen auch TFA/Methylenchlorid (55:45, Volumenteile) benutzt werden.

Die Abspaltungszeit beträgt hier nur 70 Minuten. Wie sich dünnschichtchromatographisch nachweisen läßt, werden hierbei aber mehr Nebenprodukte als mit der HCl/AcOH-Methode gebildet. Deshalb schon ist die HCl/AcOH-Methode zu bevorzugen. Hier kann die Säurebehandlung problemlos auf 4 Stunden ausgedehnt werden ohne ein Risiko bezüglich der Reinheit der Endprodukte befürchten zu müssen. Ein weiterer Nachteil der Trifluoressigsäure liegt darin, daß sie als Endprodukte schlecht kristallisierende Substanzen liefert.

Die Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylester wurden nicht weiter spektroskopisch charakterisiert. Bei den durch TFA/Methylenchlorid-Abspaltung erhaltenen Produkten ließ sich durch Elementaranalysen nachweisen, daß sie teils als Zwitterionen, teils als Trifluoracetate vorliegen. Ihr sonstiges physikalisches und chemisches Verhalten ähnelt sehr stark den gewöhnlichen Aminosäuren. So zeigen sie gute Löslichkeit in Methanol, DMF, DMSO und teils auch in Wasser.

Die N^{α}-Funktionen dieser Aminosäurederivate lassen sich durch Einführung der BOC-Gruppe schützen. Zur Schutzgruppeneinführung kann aufgrund der Basenlabilität der Benzylesterbindung die Methode von E. Schnabel (85) nicht benutzt werden. Hierzu eignet sich die Dimethylsulfoxid-Methode (86), bei der die Produkte C in DMSO suspendiert bzw. gelöst werden und mit BOC-Azid in Gegenwart von Diisopropylethylamin zur Reaktion gebracht werden. Die Reaktionszeiten liegen bei 24-48 Stunden. Bei den einfachen Aminosäuren liegen die Ausbeuten bei ca. 90 %, wogegen bei den komplizierteren, trifunktionellen Aminosäuren mit dieser Methode ein geringerer Umsatzgrad erreicht wird. Deshalb wird hier auf den Einsatz von Di-tert.-butylpyrocarbonat (87) hingewiesen. Am Beispiel des H-Glu(Bzl)-(4-carboxy-2-nitro)benzylesters und H-Ser(Bzl)-(4-carboxy-2-nitro)benzylesters kann mit dieser Methode bei einer Reak-

tionszeit von weniger als einer Stunde die geschützte Aminosäureverbindung annähernd quantitativ erhalten werden (80 % Ausbeute nach zweimaligem Umkristallisieren). Als Lösungsmittel zur Reaktion wird DMF und als Base DIPEA eingesetzt.

Die vorgeschlagenen Strukturen von D lassen sich durch die Elementaranalysen und spektroskopischen Methoden beweisen.

^{1}H-NMR-Untersuchungen

In Abb. 5 ist das ^{1}H-NMR-Spektrum des 3-Nitro-4-brommethylbenzoesäure-tert.-butylesters abgebildet.

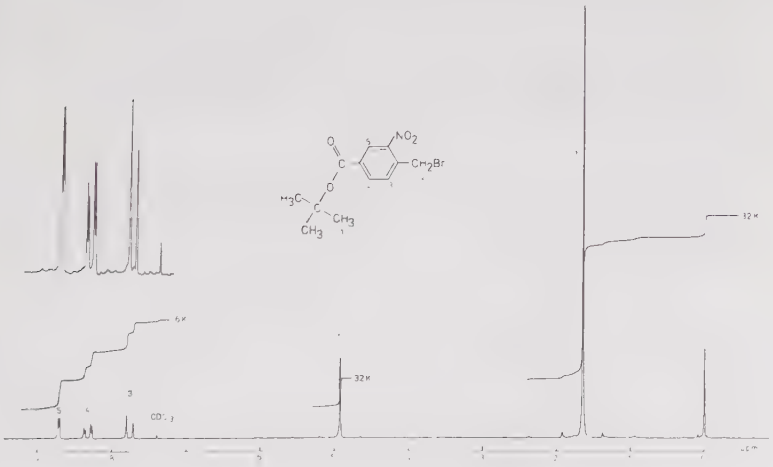


Abb. 5: ^{1}H-NMR-Spektrum des 3-Nitro-4-brommethylbenzoesäure-tert.-butylesters

Die tert.-Butylgruppe ergibt einen Peak (Singulett,s) bei 1.61 ppm, ebenso wie die $-CH_2$-Gruppe der Nitrobenzylgruppe bei 4.84 ppm. Die aromatischen Wasserstoffatome lassen sich eindeutig zuordnen und ergeben auch bei den Verbindungen B und D immer dasselbe, charakteristische Bild. Nur sehr schwach aufgespalten erscheint das isoliert stehende Wasserstoffatom neben der Nitrogruppe bei sehr tiefem Feld. Die beiden vicinalen Wasserstoffe lassen sich sehr leicht aufgrund der charakteristischen Aufspaltung erkennen. Der zur Nitrogruppe para-ständige Wasserstoff ist dabei deutlich tieffeldverschoben und zeigt eine weitere Feinstruktur, die durch den zu ihm metaständigen Wasserstoff hervorgerufen wird. Bei den Substanzen B und D erscheint die $-CH_2$-Gruppe (Nitrobenzylester-) tieffeldverschoben bei ca. 5.60 ppm. Die BOC-Gruppe ergibt ein Singulett bei ca. 1.40 ppm.

Die weiteren Signale spiegeln das Erscheinungsbild der einzelnen Aminosäuren wider und lassen sich aus Tab. 3 ersehen.

Tab. 3: ^{1}H-NMR-Signale der Aminosäuren in den Substanzen B und D

	B	D
Gly	3.96 ppm (dd,2α-H) 6.42 ppm (t,1H Amin) (400 MHz, $CDCl_3$)	3.98 ppm (dd,2α-H) 6.45 ppm (t,1H Amin) (Aceton-d_6)
Ala	1.44 ppm (d,3β-H) 4.31 ppm (m,1α-H) 6.45 ppm (d,1H Amin) (Aceton-d_6)	1.45 ppm (d,3β-H) 4.33 ppm (m,1α-H) 6.44 ppm (d,1H Amin) (Aceton-d_6)

Fortsetzung der Tab. 3

	B	D
Val	0.98 ppm (dd,6γ-H) 2.27 ppm (m,1β-H) 4.17 ppm (dd,1α-H) 6.26 ppm (d,1H Amin) (Aceton-d_6)	0.99 ppm (dd,6γ-H) 2.18 ppm (m,1β-H) 4.19 ppm (dd,1α-H) 6.30 ppm (d,1H Amin) (Aceton-d_6)
Leu	0.94 ppm (d,6δ-H) 1.67 ppm (dd,2β-H) 2.05 ppm (m,1γ-H) 4.33 ppm (dd,1α-H) 6.41 ppm (d,1H Amin) (Aceton-d_6)	0.94 ppm (d,6δ-H) 1.68 ppm (dd,2β-H) 2.03 ppm (m,1γ-H) 4.32 ppm (dd,1α-H) 6.40 ppm (d,1H Amin) (Aceton-d_6)
Asn	2.87 ppm (dd,2β-H) 4.64 ppm (dt,1α-H) 6.35 ppm (d,1H Amin) 6.50 ppm (s,1H Amid) 7.05 ppm (s,1H Amid) (Aceton-d_6)	2.80 ppm (d,2β-H) 4.62 ppm (t,1α-H) (CD_3OD)
Gln	2.20 ppm (m,2β-H) 2.40 ppm (t,2γ-H) 4.41 ppm (q,1α-H) 5.52 ppm (d,1H Amin) ($CDCl_3$)	1.93 ppm (m,2β-H) 2.21 ppm (t,2γ-H) 4.10 ppm (q,1α-H) 6.77 ppm (s,1H Amin) 7.36 ppm (dd,2H Amid) (DMSO-d_6)
Thr(Bzl)	1.32 ppm (d,3γ-H) 4.26 ppm (dq,1β-H) 4.48 ppm (dd,1α-H) 4.55 ppm (dd,2H Benzyl-) 6.00 ppm (d,1H Amin) 7.25 ppm (s,5H Benzyl-) (Aceton-d_6)	1.32 ppm (d,3γ-H) 4.26 ppm (dq,1β-H) 4.48 ppm (dd,1α-H) 4.52 ppm (dd,2H Benzyl-) 6.05 ppm (d,1H Amin) 7.25 ppm (s,5H Benzyl-) (400 MHz, Aceton-d_6)

Fortsetzung der Tab. 3

	B	D
Glu(Bzl)	2.14 ppm (m,2β-H)	2.24 ppm (dt,2β-H)
	2.47 ppm (t,2γ-H)	2.58 ppm (t,2γ-H)
	4.43 ppm (q,1α-H)	4.39 ppm (q,1α-H)
	5.09 ppm (s,2H Benzyl-)	5.12 ppm (s,2H Benzyl-)
	5.20 ppm (d,1H Amin)	6.55 ppm (d,1H Amin)
	7.31 ppm (s,5H Benzyl-)	7.35 ppm (s,5H Benzyl-)
	($CDCl_3$)	(Aceton-d_6)
Ser(Bzl)	3.70 ppm (dd,1β-H)	3.83 ppm (dd,1β-H)
	3.96 ppm (dd,1β-H)	3.95 ppm (dd,1β-H)
	4.51 ppm (s,2H Benzyl-)	4.57 ppm (s,2H Benzyl-)
	4.53 ppm (m,1α-H)	4.62 ppm (m,1α-H)
	5.38 ppm (d,1H Amin)	6.34 ppm (d,1H Amin)
	7.27 ppm (s,5H Benzyl-)	7.31 ppm (s,5H Benzyl-)
	($CDCl_3$)	(Aceton-d_6)

Die Messungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit einem 90 MHz Spektrometer durchgeführt.

Zeichenerklärung:
s = Singulett
d = Duplett
t = Triplett
q = Quadruplett
m = Multiplett

Eine Doppelaufspaltung wird durch ein vorgesetztes d angezeigt.

Mit Hilfe der Infrarotspektroskopie läßt sich bei den Verbindungen A, B und D die N-O-Valenzschwingung bei 1535 cm^{-1} als sehr typisch erkennen. Im Bereich von 3300 bis 3500 cm^{-1} zeigt sich die N-H-Schwingung der Aminogruppe (B und D).

Die Spektren der Verbindungen D zeichnen sich durch eine sehr breite Bande von 2500 bis 3600 cm^{-1} aus, die der O-H-Valenzschwingung der Carboxylgruppe zuzurechnen ist.

Stellvertretend für die Substanzklassen der BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylester ist in Abb. 6 ein IR-Spektrum mit den charakteristischen Banden abgebildet.

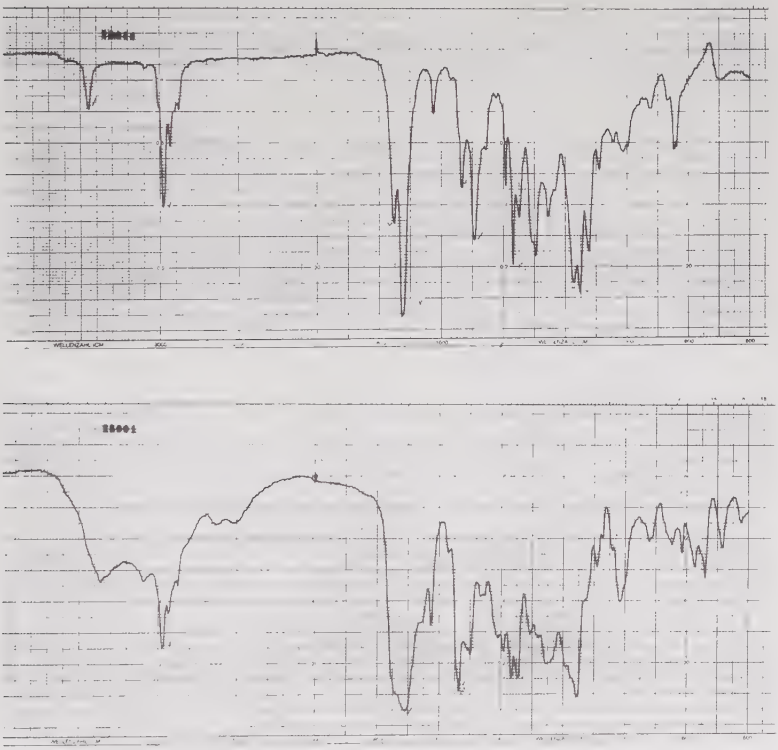


Abb. 6: oben: IR-Spektrum von BOC-Val-(4-carboxy-tert.-butylester-2-nitro)-benzylester
unten: IR-Spektrum von BOC-Val-(4-carboxy-2-nitro)-benzylester

Die wichtigen Daten weiterer IR-Spektren sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Die Massenspektren der Verbindungen B und D zeigen keinen Molekularmassenpeak (bei der Direktmessung), jedoch lassen sich die Fragmentierungspeaks eindeutig zuordnen. Diese korrelieren zum einen mit dem Fragmentierungsschema der 3-Nitro-4-brommethylbenzoesäure bzw. deren tert.-Butylester und weisen ferner die Molekularmasse der eingesetzten Aminosäure vor. Zur Verdeutlichung ist in Abb. 7 das Fragmentierungsschema mit den zugehörigen Molekularmassen eines BOC-Aminosäure-(4-carboxy-tert.-butylester-2-nitro)-benzylesters dargestellt.

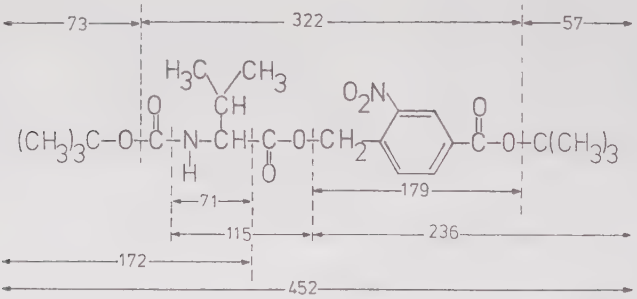


Abb. 7: Fragmentierungsschema von BOC-Val-(4-carboxy-tert.-butylester-2-nitro)benzylester

Durch den Einsatz der Felddesorptionsspektrometrie lassen sich jedoch die Molmassen von D bestimmen, wobei auch noch Peaks von dimeren Produkten auftreten. Eine Dimerisierung kann als Folge von Wasserstoffbrückenbildungen an den Carboxylgruppen auftreten. Ein dritter Peak im FD-Spektrum zeigt eine Bildung von Addukten aus BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylester mit 4-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylestern an. Dies wird durch eine intermolekulare Salzbildung erklärbar. In Tab. 4 sind die Ergebnisse der Massenspektrometrie und der IR-Spektroskopie zusammengefaßt.

Tab. 4: Daten zur Massenspektrometrie und IR-Spektroskopie

	Massenspektrum m/e [%] Intens.	IR(KBr) ν_{max} [cm^{-1}]
A	317(10,M+1),244(74), 180(48),135(28),63(30), 63(30),57(100)	2980,1720,1540,1355,1305 1140,840,760,695,610
B(Gly)	280(10),236(10),180(42), 129(75),74(58),57(100)	3390,2980,2930,1760,1710, 1535,1365,1300,1255,1170 (Film)
D(Gly)	710,610,355(M+1) (FD)	3380,2985,1750,1725,1540 1200,1160
B(Ala)	295(12),180(40),144(74), 88(58),57(100)	3350,2980,1750,1725,1535, 1365,1305,1170,990,740
D(Ala)	180(18),144(27),88(20), 56(100)	3360,2980,1680-1750,1535, 1345,1160,1070
B(Val)	323(24),236(48),180(100), 172(100),164(22),116(100), 98(22),72(100),57(100)	3450,2980,1755,1725,1535, 1495,1370,1175,1150(CCl_4)
D(Val)	323(6),236(9),180(24), 172(29),116(80),72(96), 57(100)	3370,2970,1720,1535,1370, 1350,1155
B(Leu)	nicht vermessen	
D(Leu)	181(10),152(8),139(10), 138(100),110(6),100(10), 71(27),55(60)	3380,2940,2860,1745,1710, 1530,1370,1340,1160
B(Asn)	187(36),180(100),159(28), 131(77),113(32),87(100), 70(32)	3420,3360,2980,1720,1535, 1365,1170

Fortsetzung der Tab. 4

	Massenspektrum m/e [%] Intens.	IR(KBr) ν_{max} [cm^{-1}]
D(Asn)	828,723,412(M+1),75 (FD)	3430,3360,2980,1650-1750, 1535,1345,1160
B(Gln)	236(4),201(24),180(60), 179(48),173(24),145(52), 101(70),84(100)	3350,3200,2980,2930,1750, 1720,1680,1625,1535,1160
D(Gln)	179(5),173(6),155(5), 137(3),84(10),56(100)	3480,3350,2990,2940,1915 (breit),1740,1705,1685, 1625,1530,1515,1165
B(Thr)	415(12),383(34),309(20), 236(42),180(66),164(30), 135(12),120(10),107(30), 91(100),57(100)	3450,2980,1725,1530,1370, 1150 (Film)
D(Thr)	181(44),152(10),138(100), 100(18),82(17),56(100) (DCHA-Salz)	3340,2940,2860,1720,1530, 1370,1160 (CCl_4)
B(Glu)	574(M+1),573,517,292,190, 180,91 (FD)	3450,2980,1725,1530,1370, 1150 (Film)
D(Glu)	180(20),165(22),163(50), 137(25),136(36),119(22), 105(20),92(10),91(30), 85(76),84(100),77(20), 65(28),56(52)	3360,2980,1755,1730,1700, 1625,1540,1515,1345,1165
B(Ser)	401(12),383(15),311(20), 236(45),192(28),180(90), 150(30),132(26),107(24), 91(100),57(100)	3380,2980,1720,1700,1625, 1535,1505
D(Ser)	950,475(M+1) (FD)	2980,1760,1720,1625,1535, 1500,1160,740,695

Wie sich durch gaschromatographische Untersuchungen auf Razematanteile mit Hilfe einer Chirasil-Val-Säule feststellen läßt (88,89), treten bei der Synthese keine erhöhten D-Anteile der Aminosäuren auf.

4.3. Umsetzung mit polymeren Trägern

Ein BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylester läßt sich problemlos in Methylenchlorid oder DMF mit DCCI voraktivieren und an H-Gly-POE kuppeln. Als Base dient N-Methylmorpholin und die Reaktion kann einfach mit dem Fluramtest verfolgt werden. Für den Fall des Alanins genügte eine Reaktionszeit von einer Stunde, um alle Aminofunktionen des Glycins abreagieren zu lassen. Nach der Reaktion lassen sich Überschüsse an Kupplungskomponente durch mehrmaliges Umfällen quantitativ entfernen.

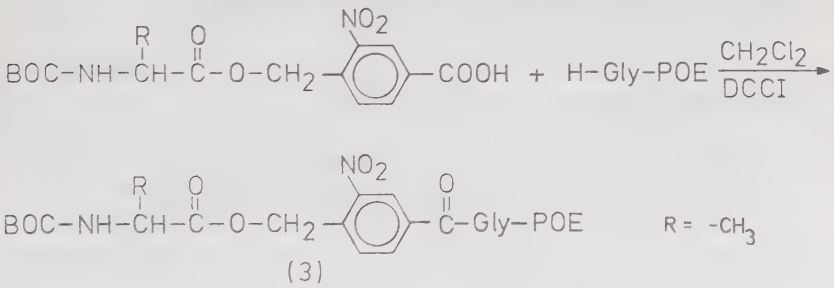


Abb. 7: Veresterung des polymeren Trägers mit BOC-Ala-(4-carboxy-2-nitro)benzylester

Die anschließend durchgeführte Aminosäureanalyse erbrachte das Ergebnis Gly:Ala = 1.00:0.98

Auch für die Derivate BOC-Leu-(4-carboxy-2-nitro)benzylester und BOC-Glu(Bzl)-(4-carboxy-2-nitro)benzylester (90) konnten mit H-Gly-POE_{6000} gleich gute Resultate erzielt werden. Wie durch M. Dengler (91) gezeigt werden konnte, ist der BOC-Ala-(4-carboxy-2-nitro)benzylester auch an Pfropfpolymeren vom Polystyrol-POE-Typ einsetzbar. Einen guten Umsatzgrad kann man auch durch Einsatz von HOBT über die Aktivesterbildung erhalten, wie dies an den Pfropfpolymeren bewiesen wurde.

Dieses Ergebnis wurde von H. Hellstern (92) durch den Einsatz des BOC-Asn-(4-carboxy-2-nitro)benzylesters an derartigen Trägern bestätigt.
Bei den Kupplungsreaktionen wurde in keinem Fall das Auftreten überhöhter D-Anteile der Aminosäuren festgestellt.

Hieraus kann gefolgert werden, daß das chemische Verhalten dieser neuen Aminosäurederivate bei der Kupplung mit polymeren Trägern keine Unterschiede zu den bereits in der Peptidsynthese erprobten BOC-Aminosäuren zeigt.

4.4. Diskussion

Der Einsatz von BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzoesäuren zur Fixierung der C-terminalen Aminosäuren an polymeren Trägern bietet gegenüber den bisherigen Methoden ganz entscheidende Vorteile. So kann die Kupplungsreaktion durch die üblichen analytischen Methoden verfolgt werden und zudem kann eine quantitative Beladung des Polymers erfolgen. Neben dem hohen Beladungsgrad ist die chemisch eindeutige Verknüpfung der Aminosäure mit der Ankerverbindung besonders zu betonen. Gerade der Anforderung der eindeutigen Verknüpfung wird die Cäsiumsalzreaktion am polymeren Träger nicht gerecht. Ferner bietet der Einsatz dieser neuartigen Aminosäurederivate einen hohen Zeitgewinn gegenüber den bislang bekannten Methoden.

Sowohl die Kupplungsreaktionen als auch die Aufarbeitungsschritte sind mit einem sehr geringen Zeitaufwand verbunden.

Die Darstellung der BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)-benzylester bereitet zudem keine besonderen Schwierigkeiten. So verlaufen die einzelnen Reaktionsschritte ausgehend von der 3-Nitro-4-brommethylbenzoesäure fast ausnahmslos mit mindestens 80 % Ausbeute. Das bedeutet, die Gesamtausbeute über alle Reaktionsstufen hinweg liegt bei durchschnittlich 55 %. Bei den Aminosäuren H-Thr(Bzl)-(4-carboxy-2-nitro)benzylester und H-Asn-(4-carboxy-2-nitro)benzylester kann die geringe Ausbeute bei der Schutzgruppeneinführung durch die Anwendung anderer Reaktionsbedingungen ebenfalls wesentlich gesteigert werden (siehe bei den entsprechenden Serin- und Glutaminverbindungen). Bei sämtlichen Zwischen- und Endprodukten treten keine besonderen Reinigungsprobleme auf. Die Endprodukte lassen sich meist rasch kristallisieren und bleiben so lagerfähig. Probleme bezüglich der Kristallisation zeigten sich bei den Threonin- und Leucinverbindungen, die sich jedoch durch die Bildung der Dicyclohexylammoniumsalze beheben ließen.

Als Einsatzgebiet der BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)-benzylester dürfen sämtliche polymeren Träger angesehen werden. Hier wurde bislang glycinverestertes POE und Polystyrol-POE eingesetzt, jedoch dürfte ein erfolgreicher Einsatz an aminofunktionalisiertem Polystyrol ebenfalls möglich sein.

4.5. Synthesezyklus der Liquid-Phase-Methode

Der Aufbau der Peptide nach der Liquid-Phase-Methode erfolgt nach den sich prinzipiell wiederholenden Standardreaktionen. Hierzu zählen der Abspaltungsschritt der N^{α}-Schutzgruppe sowie der nachfolgende Kupplungsschritt.

a) Abspaltung der N^{α}-Schutzgruppe

Da als N^{α}-Schutz die BOC-Gruppe gewählt wurde, läßt sich deren Abspaltung sehr vorteilhaft in 1.2 N HCl/AcOH sowie in TFA/CH_2Cl_2 (55:45/Volumenteile) durchführen, wobei der HCl/AcOH der Vorzug gegeben werden muß, da hierbei weniger Nebenprodukte zu erwarten sind.
Man löst das Peptidpolymer in 1.2 N HCl/AcOH und rührt 20 Minuten unter Feuchtigkeitsausschluß. Das Abspaltungsreagens wird dann am Rotationsverdampfer entfernt und das zurückbleibende Öl zweimal umgefällt. Die Löslichkeit des Peptidpolymers nahm hierbei ständig ab, sodaß ab dem Dekapeptidpolymer auf das System TFA/CH_2Cl_2 übergegangen werden mußte.

b) Kupplungsschritt

Man stellt sich eine möglichst konzentrierte Lösung des Peptidpolymers in einem geeigneten Lösungsmittel her. Am geeignetsten ist Methylenchlorid und wenn hiermit keine gute Löslichkeiten erzielt wird, muß mit DMF und später mit DMSO weitergearbeitet werden. In einem separaten Gefäß wird aus einer BOC-Aminosäure mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid das symmetrische Anhydrid hergestellt. Die Kupplungskomponente wird zur Zurückhaltung des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs über eine Glasfritte zum Polymer filtriert. Als Base wird N-Methylmorpholin zugesetzt. Der Ansatz wird 2 1/2 bis 5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend wird das Peptidpolymer mit Ether ausgefällt. Durch mehrmaliges Umfällen läßt sich das Produkt sehr rein gewinnen, sodaß keine niedermolekularen Überschüsse nachweisbar bleiben. Während der Reaktion wird mit Hilfe des Fluramtests (49,50) der Umsatzgrad überprüft, wobei durch die bei 366 nm im UV auftretende grüne Fluoreszenz sehr wirksam und zuverlässig freie, primäre Aminofunktionen angezeigt werden. Nach der

Kupplung kann der Umsatzgrad auch durch eine Aminosäureanalyse getestet werden.

4.6. Die Wahl der Schutzgruppen und Kupplungsmethoden

Durch die Wahl der N^{α}-BOC-Gruppe lassen sich für die Drittfunktionen nur solche Schutzgruppen einsetzen, die dem häufigen Einsatz von HCl/AcOH bzw. TFA/CH_2Cl_2 widerstehen. Selbst bei geringfügiger Abspaltung einer Drittfunktionsschutzgruppe bei der BOC-Abspaltung kann das Gelingen der Synthese entscheidend negativ beeinflußt werden. Da die Peptide nach der Photolyse in geschützter Form isoliert werden sollen, wird auch auf die Stabilität während der Photolyse ein großer Wert gelegt. Die Drittfunktionsschutzgruppen sind so konstruiert, daß sie durch Fluorwasserstoff entfernt werden können. Lediglich die Mercaptoschutzgruppe des Cysteins ist stabil gegenüber diesem Reagens und läßt sich durch oxidative Sulfitolyse in die Thiosulfatform überführen (93). Für die ε-Funktion des Lysins wurde an Stelle des bislang oft verwendeten Z-Schutzes (94) die säurestabilere o-BrZ-Schutzgruppe (95,96) eingesetzt. Threonin, Serin und die γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure sind mit der Benzylschutzgruppe versehen (97-99). Die phenolische Gruppe des Tyrosins wurde mit der o-ClZ-Schutzgruppe geschützt (56,108). Die bislang häufig verwendete Benzylschutzgruppe ist gegenüber den BOC-Abspaltungsbedingungen nicht stabil genug (109) und gibt bei der Abspaltung mit HF (110) als Nebenprodukt 3-Benzyltyrosin (111,112). Für die Guanidinofunktion des Arginins wird an Stelle des p-Toluolsulfonats das p-Methoxybenzolsulfonat gewählt (113), da durch die Methoxyfunktion eine leichtere Abspaltung mittels HF gewährleistet bleiben sollte.

Der Imidazolring des Histidins mußte bei den zwei einzubauenden Histidinmolekülen aufgrund unterschiedlicher Auf-

bautaktiken verschiedenartig geschützt werden. An der Stelle B_5 wurde die N^{im}-BOC-Schutzgruppe benutzt. Dieser Imidazolschutz hat die Aufgabe, den zwitterionischen Charakter des N^{α}-BOC-Histidins aufzuheben und damit gute Löslichkeitseigenschaften zu vermitteln und zum anderen Nebenreaktionen mit DCCI zu unterbinden (100). Nach der Abspaltung der N^{α}-Schutzgruppe liegt der Imidazolring dann natürlich auch frei vor, das bedeutet, Nebenreaktionen sind jetzt prinzipiell möglich. Das Histidin an der Stelle B_{10} wurde durch die stabilere N^{im}-Trt-Gruppe geschützt (101-106).

Da N^{α}-BOC-His(BOC)-OH nach der Methode der symmetrischen Anhydride in unbefriedigenden Ausbeuten an dieser Stelle eingebaut wird (47), wurde die Synthesetaktik so geändert, daß Histidin als Fragment BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH eingesetzt wurde. Die Tritylschutzgruppe ist geeignet bei einem derartigen Fragment als permanenter und für die Reaktionsbedingungen stabiler Rest eingesetzt zu werden. Eine Kupplung an das polymergebundene Nonadekapeptid kann hier über die DCCI/HOBT-Methode erfolgen (14). Die Tritylschutzgruppe wird durch stark saure Abspaltungsreagentien (HF, TFA) rasch und quantitativ abgespalten, während sie HCl/AcOH bzw. HCl/Dioxan weitestgehend widersteht. Da als BOC-Abspaltungsreagens TFA/CH_2Cl_2 eingesetzt wurde, liegt am Ende auch hier der Imidazolring ungeschützt vor. Als weitere Forderung sollte der Tritylschutz die Photolysereaktion des Dokosapeptids überstehen. Über die photolytische Instabilität des Tritylschutzes wird in (3 , S. 83) berichtet. Durch die Photolyse eines N^{im}-Trt-haltigen Testpeptids läßt sich jedoch die weitestgehende Stabilität dieser Schutzgruppe beweisen. Die Amidfunktionen von Glutamin und Asparagin wurden nicht geschützt. Problematisch ist hier besonders das Asparagin, das mit DCCI sehr leicht unter Wasserabspaltung zu β-Cyanoalanin reagiert. Durch den Einsatz von äquimolaren

Mengen an HOBT soll diese Nebenreaktion unterbunden werden (104).

Die übrigen Aminosäurederivate wurden ohne weitere Zusätze mit DCCI als Aktivierungsreagens gekuppelt. Die symmetrischen Anhydride lassen sich separat unter Kühlung in Methylenchlorid, Tetrahydrofuran und DMF herstellen (107). Die anschließende Kupplung kann wahlweise in Methylenchlorid, DMF oder DMSO durchgeführt werden. Bezüglich der Razemisierung tritt bei diesem C-terminalen Aufbau kein Risiko auf.

4.7. Beobachtungen zum Aufbau der Insulin-B-Kette

Nachdem das solubilisierende Trägersystem Gly-POE durch die quantitative Beladung mit der C-terminalen Aminosäure umgesetzt wurde, ließen sich die weiteren Aminosäuren bis zur Stufe des Oktapeptids problemlos ankuppeln. Die BOC-Abspaltungen mit 1.2 N HCl/AcOH verliefen sehr gut, da sich das Löslichkeitsverhalten des Peptidpolymers darin als günstig erwies. Die Kupplungsschritte wurden mit einem dreifachen Überschuß an Kupplungskomponente durchgeführt und als Lösungsmittel ließ sich Methylenchlorid verwenden. Mit dem Fluramtest ließen sich die Reaktionsumsätze gut verfolgen, obwohl eine kräftige Eigenfluoreszenz eines solchen Peptidpolymers zu beobachten ist. Da nach jeder Aufbaustufe eine Aminosäureanalyse durchgeführt wurde, läßt sich der homogene Verlauf der Synthese beweisen. Eine Beladungsabnahme, das bedeutet, eine Spaltung der POE-Gly-Bindung bzw. Anker-Ala-Bindung konnte nicht festgestellt werden.

Ab der Nonapeptidstufe mußte als Lösungsmittel eine Methylenchlorid/DMF-Mischung eingesetzt werden. Probleme traten jetzt mit der Kupplung des von R. Eberle (47) vorge-

schlagenen BOC-Arg(Mbs)-OH auf. Der Ablauf dieser Kupplungsreaktion konnte mit dem Fluramtest nicht mit absoluter Sicherheit quantifiziert werden, sodaß als zweite analytische Methode die Aminosäureanalyse eingesetzt werden mußte. Obwohl das Peptidpolymer nach Abschluß der Kupplungsreaktion 8-mal umgefällt wurde, erbrachte die Aminosäureanalyse einen Arginingehalt von 150 % anstelle der erwarteten 100 %. Eine Nachkupplung erschien deshalb sinnlos. Dieser überschüssige Gehalt an Arginin blieb bis zum Ende der Synthese erhalten. Um jedoch einen Eindruck über den Syntheseverlauf zu erhalten und die Probleme des Argininüberschusses zu erklären, wurden hier 4.2 g Nonapeptidpolymer zurückbehalten und die photolytische Abspaltung des Peptids vom Träger untersucht. Da aber nach all diesen Untersuchungen der Ablauf der Argininkupplung nicht gesichert war, wurde zur Blockierung eventueller, freier Aminofunktionen ein Acetylierungsschritt (23,56) durchgeführt, um damit der Bildung einer Fehlsequenz vorzubeugen.

Ab dem Dekapeptidpolymer mußte als Abspaltungsreagens Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (55 ml TFA + 45 ml CH_2Cl_2) angewandt werden, da sich die Löslichkeit des Peptidpolymers in 1.2 N HCl/AcOH stark verschlechterte. Alle weiteren Kupplungen wurden routinemäßig mit einem 4-fachen Überschuß an Anhydrid zweimal durchgeführt. Vom Undekapeptidpolymer wurden 13.5 g zurückbehalten, um an diesem Material die photolytische Abspaltung in Methanol und DMSO zu studieren, und das erhaltene Peptid auf Fehl- bzw. Rumpfsequenzen zu untersuchen.

Ab dem Dodekapeptid wurde neben der zweimaligen Kupplungsreaktion auch eine Umsetzung mit Acetanhydrid durchgeführt, um eine Fehlsequenzbildung sicher auszuschließen. So verliefen die Abspaltungs- und Kupplungsschritte bis zum Nonadekapeptid ohne nennenswerte Probleme. Das Löslichkeitsverhalten war gut, obwohl allmählich das Methylen-

chlorid ganz durch DMF bzw. DMSO ersetzt werden mußte. Trotz der starken Eigenfluoreszenz der Reaktanten und der relativen Abnahme an Aminofunktionen konnte der Reaktionsverlauf durch den Fluramtest sicher beobachtet werden. Der Weiteraufbau bis zum Dokosapeptid wurde gesondert über den stufenweisen Aufbau und über eine Fragmentkondensation untersucht. Bei der stufenweisen Kupplung verlief sowohl der Einbau des BOC-His(BOC)-OH, als auch die Kupplung des Serins nicht eindeutig. Im Falle des Histidins wurde mit dem Fluramtest eine sehr geringe Reaktionsgeschwindigkeit festgestellt, und mit der Aminosäureanalyse eine nicht ganz befriedigende Gehaltsanalyse. Im Gegensatz hier wurde bei der Kupplung des Serins ein viel zu hoher Wert erreicht, der den des Histidins um fast das doppelte überstieg.

Bei der Verwendung des Tripeptids BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH, das nach der DCCI/HOBT-Methode gekuppelt wurde, konnte mit dem Fluramtest eine sehr hohe Umsatzgeschwindigkeit festgestellt werden. Da überschüssiges Tripeptid aufgrund seiner hervorragenden Löslichkeit problemlos entfernt werden konnte, ließ sich mit Hilfe der Aminosäureanalyse eine zuverlässige Bestimmung der Umsetzung nachweisen. Durch die bessere Aminosäurezusammensetzung nach der Fragmentkupplung wurde der Aufbau mit dem Tripeptid durchgeführt. Zur Charakterisierung wurden hier 2 g Peptidpolymer zurückbehalten, um das Peptid abzuspalten und zu isolieren.

Der weitere Verlauf des Aufbaus wurde durch ein zunehmend schlechter werdendes Löslichkeitsverhalten gekennzeichnet. Zum Lösen wurde DMF/DMSO benutzt, wobei für den Lösungsvorgang Zeiten bis zu einer Stunde in Kauf genommen werden mußten. Die Kupplungsschritte und Abspaltungsreaktionen brachten bis zum Leucin an der Stelle B_6 keine Probleme.

Der Einbau der Sequenz Asn-Gln-His erwies sich dann jedoch als problematisch. Die Zahl der freien Aminogruppen fiel von B_6 (Leu) bis an die Stelle B_3 (Asn) um ca. 50 % ab.

Zusammenfassend kann zu den Kupplungsreaktionen folgendes gesagt werden:
Alle Aminosäurederivate brachten bei der Umsetzung mit dem Peptidpolymer keine Schwierigkeiten, mit Ausnahme des Arginins und der gesamten Sequenz Asn-Gln-His. Zum Arginin ist festzustellen, daß es trotz des Gehalts von 150 % bei der Polymeranalyse nur mit einer etwa 70 %-igen Ausbeute in der gewünschten Form gekuppelt hat. Aus der Aminosäureanalyse der in der Sequenz folgenden Aminosäure läßt sich feststellen, daß nach dem Arginin ca. 30 % der anfänglichen Aminofunktionen nicht mehr zur Verfügung standen.

In Abb. 8 sind diese Zusammenhänge graphisch dargestellt. Die analytische Grundlage bildet die Aminosäureanalyse.

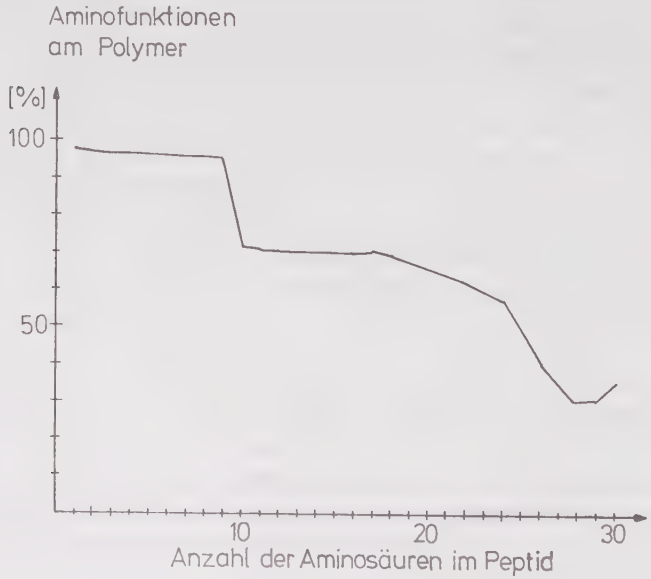
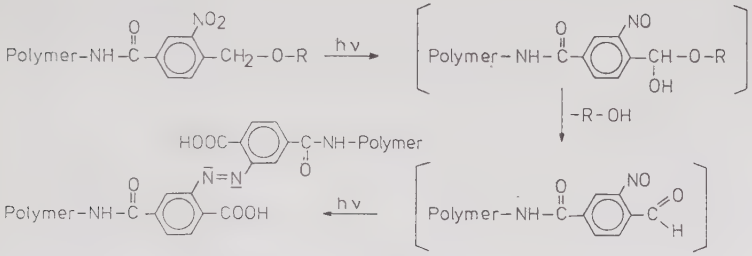


Abb. 8: Graphische Darstellung der Aminofunktionenkonzentration am Träger während des Aufbaus der polymergebundenen Insulin-B-Kette

5. Abspaltung durch Photolyse

5.1. Der Einsatz photolabiler Gruppen

A. Patchornik hat 1970 photolabile Schutzgruppen auf der Basis der 2-Nitrobenzylester eingeführt (114). Dieses Strukturprinzip läßt sich auf Ankerverbindungen zur Peptidsynthese an polymeren Trägern übernehmen. Der Reaktionsablauf bei der Bestrahlung ist in Abb. 9 dargestellt.



R = geschütztes Peptid ; Polymer = POE-Gly

Abb. 9: Reaktionsmechanismus der photolytischen Peptidabspaltung

Bei der Bestrahlungsreaktion wird aus dem Nitrobenzylester in einem Umlagerungsschritt das intermediär auftretende Nitroso-O-acylhalbacetal gebildet, das rasch in das Nitrosobenzaldehydderivat zerfällt und dabei das geschützte Peptid abspaltet. Neben den geschützten Peptidylsäuren können auch Peptidylamide dargestellt werden (115-117). Eine weitere Übersicht an photolabilen Schutz- und Ankergruppen wird von V.N.R. Pillai gegeben (118).

5.2. Photolyse des geschützten Nonapeptidpolymers

Die photolytische Abspaltung des geschützten Nonapeptids wurde in Methanol durchgeführt, wobei unter Stickstoff als Schutzgas gearbeitet wurde. Als Bestrahlungszeit wurden 17 Stunden gewählt. Die Photolysedauer läßt sich aus Abb. 10 entnehmen (58).

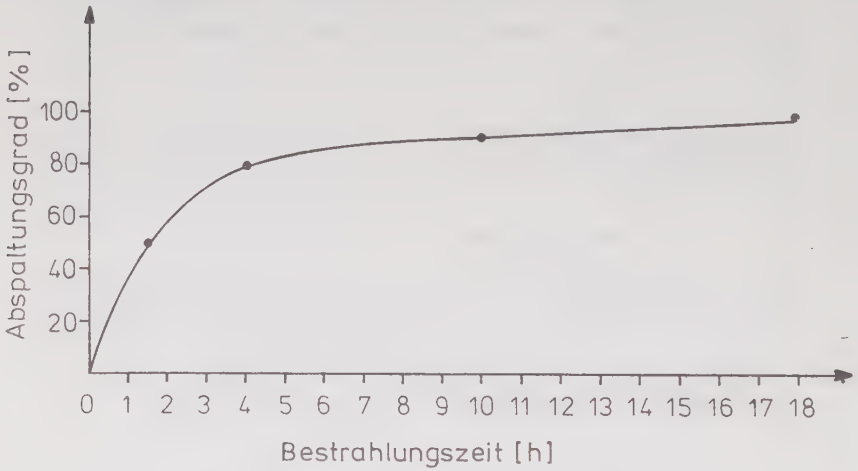


Abb. 10: Graphische Darstellung des Abspaltungsgrads als Funktion der Bestrahlungszeit

Nach der Bestrahlung in Methanol hat sich an der Reaktionslösung bezüglich Färbung und Geruch keine Veränderung im Vergleich zu den Anfangsbedingungen der Reaktion ergeben. In jedem Fall ergab sich eine leicht gelbliche, klare Lösung. Zur Abtrennung des abgespaltenen Peptids vom Polymer wurde deren unterschiedliches Löslichkeitsverhalten ausgenutzt. Die Reaktionslösung wird auf 500 ml aufgefüllt und dann eine Stunde bei 40°C gehalten. Dieser Ansatz wird dann drei Stunden im Tiefkühlschrank bei -30°C belassen.

POE ist besonders schlecht in kaltem Methanol löslich und kristallisiert bei diesen Temperaturen fast quantitativ aus. Das Peptid jedoch bleibt weitgehend in Lösung und kann durch einfache Filtration entfernt werden. Um aber bei größeren Peptiden eine hohe Abtrennungsausbeute zu erhalten, muß dieses Umkristallisieren mindestens dreimal durchgeführt werden. Die relativen Konzentrationen an Produkt bzw. Polymer im Filtrat lassen sich nach jedem Trennungsgang mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie ermitteln. So konnte gezeigt werden, daß nach dreimaligem Umfällen das Peptid annähernd quantitativ vom Polymer abgetrennt wurde. Das Polymer wurde einer Aminosäureanalyse unterzogen und damit eine Restbeladungsanalyse erstellt, die einen Verbleib von etwa 15 % Peptid erbrachte. Dieses restliche Peptid kann zum einen noch kovalent am Träger gebunden sein, ist andererseits mit der Dünnschichtchromatographie als freies, nicht abgetrenntes Peptid am Polymer nachweisbar. Daraus erfolgt der Schluß, daß die Photolyse des Nonapeptids mit einer Ausbeute von mehr als 85 % verlaufen ist. Im Filtrat wurde neben dem gewünschten Peptid polymere Anteile vom Träger nachgewiesen. Diese Verunreinigungen wurden im vorliegenden Fall durch Gelchromatographie an einer LH20/MeOH-Säule abgetrennt. Das vollgeschützte Peptid:

BOC-Arg(Mbs)-Gly-Phe-Phe-Tyr(o-ClZ)-Thr(Bzl)-Pro-Lys(O-BrZ)-Ala-OH

wurde nach dieser Reinigungsoperation in einer Ausbeute von 49 % bezogen auf das anfänglich eingesetzte BOC-Ala-Polymer erhalten.

5.3. Charakterisierung des Nonapeptids

Die Aminosäurezusammensetzung des geschützten Nonapeptids zeigte im Vergleich zu den theoretischen Werten keine wesentliche Abweichung:

	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.03	0.92	1.92	0.95	1.05	0.99	0.99	1.00
Theorie:	1	1	2	1	1	1	1	1

Neben diesem Hauptprodukt gelang es auch, aus der Rumpfpeptidfraktion ein Peptid folgender Sequenz nachzuweisen:

Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala

Zur weiteren Bestimmung des Nonapeptids wurde ein Probe des geschützten Peptids mit flüssigem Fluorwasserstoff behandelt (110,119). Die Abspaltung der Schutzgruppen erfolgte bei 0°C in Gegenwart von Anisol, dem eine Scavengerfunktion zufällt. Da es sich bei dem Peptid B_{22-30} um ein basisches Peptid handelt, wurde eine Reinigung an CM-Sephadex durchgeführt. Durch diese Chromatographie ergab sich eine Endausbeute von 26 % reinem Nonapeptid, bezogen auf das eingesetzte BOC-Ala-Polymer. Nach den dünnschichtchromatographischen, elektrophoretischen und säulenchromatographischen Untersuchungen handelt es sich um ein reines Produkt. Dies wurde auch durch die Aminosäureanalyse bestätigt:

	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef:	1.00	1.00	2.04	1.01	0.98	0.99	0.99	1.00
Theorie:	1	1	2	1	1	1	1	1

Durch selektive Anfärbemethoden wurde das freie Vorliegen der Guanidinogruppe des Arginins (Sakaguchi-Test) und der phenolischen Gruppen des Tyrosins (Pauly-Test) bewiesen. Wie sich mit Hilfe eines gaschromatographischen Tests nachweisen ließ, zeigte keine der Aminosäuren einen überhöhten D-Anteil (120).
Die Molekularmasse des ungeschützten Nonapeptids wurde mit der Felddesorptionsmassenspektrometrie bestimmt, wodurch

die angenommene Struktur bestätigt wurde. Der Molekülpeak erscheint bei 1086.
Wie sich durch ein CD-Spektrum in Wasser als Lösungsmittel zeigen ließ, liegt das Peptid in einer ungeordneten Struktur vor (stark negative Bande bei 205 nm).

5.4. Photolyse des Undekapeptids

Das Undekapeptidpolymer wurde analog 5.3. einer photolytischen Abspaltungsreaktion unterzogen. Dabei wurden als Lösungsmittel Methanol und DMSO angewandt. DMSO mußte auf seine Anwendbarkeit untersucht werden, da bei großen Peptiden eine gute Löslichkeit in Methanol nicht mehr gewährleistet ist. Bei der Reaktion in DMSO wurde nach der Bestrahlung eine leichte Gelbfärbung der Reaktionslösung, sowie die Entstehung übelriechender Beiprodukte festgestellt. Die Reinheit des abgetrennten Rohpeptids erreichte nicht das Niveau des in Methanol abgespaltenen Produkts. Nach der Reinigung durch Gelchromatographie ergaben sich dann für beide Abspaltungsmethoden dieselben Ausbeuten und dieselben Reinheitsgrade. Nach der Aufarbeitung des bestrahlten polymeren Trägers wurde an diesem eine Restbeladung von ca. 20 % ermittelt. Da die Abtrennung des geschützten Peptids über einen Methanoltrennungsgang erfolgte, wird in der Restbeladungsanalyse auch abgespaltenes, aber nicht abgetrenntes Peptid miterfaßt.

Demnach verlief auch hier die photolytische Abspaltung mit einer Ausbeute von mehr als 80 %.

Das vollgeschützte Undekapeptid wurde nach zweimaliger Gelchromatographie in einer Ausbeute von 48 %, bezogen auf das anfängliche BOC-Ala-Polymer, erhalten.

BOC-Gly-Glu(Bzl)-Arg(Mbs)-Gly-Phe-Phe-Tyr(o-ClZ)-Thr(Bzl)-Pro-
HO-Ala-Lys(o-BrZ)

Abb. 11: Primärstruktur des geschützten Undekapeptids

5.5. Charakterisierung des Undekapeptids

Die Aminosäurezusammensetzung des so erhaltenen Undekapeptids war zunächst nicht sehr befriedigend:

	Gly	Glu	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.43	0.66	1.09	1.70	0.97	1.00	1.04	1.05	0.94
Theorie:	2	1	1	2	1	1	1	1	1

Durch die schlecht verlaufende Argininkupplung an der Stelle B_{22} und den anschließenden Acetylierungsschritt mit Acetanhydrid trat jetzt eine Rumpfsequenz auf, die sich durch Chromatographie an LH 20 nicht abtrennen ließ. An dieser Stelle wurde dann trotz der nicht sauberen Aminosäurezusammensetzung des geschützten Peptids die Schutzgruppenabspaltung mit HF durchgeführt, da die Reinigung über eine Ionenaustauschsäule Erfolg versprach.

Der Einsatz der CM-Sephadex-Säule (siehe 5.3.) brachte keine saubere Abtrennung der Rumpfsequenzen. Mit dieser Trennsäule konnte nur durch geschicktes Schneiden der Peptidfraktion eine Anreicherung des Undekapeptids erreicht werden. Im Gegensatz hierzu war die Verwendung einer CM-Cellulose-Säule mit Ammoniumacetatpuffer sehr erfolgreich. Das Elutionsdiagramm ist auf Seite 87, Abb. 13 dargestellt. Durch die gute Trennleistung gelang es, das Undekapeptid B_{20-30} sehr rein zu gewinnen. Die Aminosäureanalyse erbrachte das Ergebnis:

	Gly	Glu	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.91	1.10	1.03	2.00	1.03	0.92	1.02	1.00	1.00
Theorie:	2	1	1	2	1	1	1	1	1

An einer Chirasil-Val-Säule wurden die Aminosäuren nach der Hydrolyse einer Peptidprobe auf ihren Razemisierungsgrad untersucht. Hierbei wurden keine erhöhten D-Anteile der einzelnen Aminosäuren festgestellt. Eine Untersuchung des Peptids durch Elektrophorese und Dünnschichtchromatographie zeigte keine Verunreinigungen an. Die CD-Spektren zeigten eine ungeordnete Struktur an.

Fehlsequenzanalyse

Durch die gute Auftrennung der CM-Cellulose-Säule wurden neben dem sauberen Undekapeptid drei weitere Sequenzen isoliert und charakterisiert:

(1) Das C-terminale Oktapeptid B_{23-30}, an das Arginin nicht gekuppelt hat.

(2) Das C-terminale Pentapeptid B_{26-30}.

(3) Ein Dekapeptid, das offensichtlich folgende Fehlsequenz darstellt:
H-Gly-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala-OH
Demnach hat das Aminosäurederivat BOC-Glu(Bzl)-OH trotz zweimaliger Kupplung nicht quantitativ mit Arginin reagiert. An dieser Stelle wurde noch nicht routinemäßig acetyliert, weshalb eine Fehlsequenzbildung prinzipiell möglich war.

Reinigung des geschützten Undekapeptids

Das freie Undekapeptid konnte durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt werden. Wie aber das Elutionsdiagramm zeigte, war das Ausgangsmaterial, das geschützte Peptid, noch mit Rumpf- bzw. Fehlsequenzen behaftet. Es gelang,

das geschützte Undekapeptid an einer Kieselgelsäule von diesen Verunreinigungen zu befreien. Nach einer anschließenden Gelchromatographie war das Peptid analysenrein. Die Aminosäureanalyse erbrachte das Ergebnis:

	Gly	Glu	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.65	0.88	1.04	1.88	1.10	1.00	1.00	1.09	1.01
Theorie:	2	1	1	2	1	1	1	1	1

Von einer Probe dieses Peptids wurden mit HF die Schutzgruppen entfernt, und eine Reinigung an der CM-Cellulose-Säule durchgeführt. Das Elutionsdiagramm (siehe Seite 91, Abb. 15) zeigt nun einen einzigen Hauptpeak neben lediglich sehr geringen Verunreinigungen. Die Aminosäureanalyse des freien Peptids erbrachte:

	Gly	Glu	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.93	1.01	1.00	2.04	1.00	0.93	1.01	1.00	0.96
Theorie:	2	1	1	2	1	1	1	1	1

5.6. Photolyse des Dokosapeptids

Das C-terminale Dokosapeptid der Insulin-B-Kette ließ sich durch Bestrahlung in DMSO erfolgreich abspalten. Die Abtrennung vom polymeren Träger ließ sich ebenfalls durch mehrmaliges Umfällen aus Methanol, dem 5 % DMF bzw. DMSO zugesetzt wurde, durchführen. Wegen der relativ schlechten Löslichkeit dieses großen Peptids mußten am Polymer anhaftende Peptidrückstände durch Säulenchromatographie abgetrennt werden. Auf diese Weise wurde der Abspaltungsgrad zu etwa 69 % bestimmt.

Das geschützt isolierte Dokosapeptid hat folgende Struktur:

BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-Val-Glu(Bzl)-Ala-Leu-Tyr(o-ClZ)-Leu-Tyr(o-ClZ)-Phe-Phe-Gly-Arg(Mbs)-Glu(Bzl)-Gly-Cys(SiP)-Val-Thr(Bzl)-Pro-Lys(o-BrZ)-Ala-OH

Vom isolierten Rohpeptid wurde eine Aminosäureanalyse durchgeführt, deren Ergebnis zunächst sehr unbefriedigend war.

	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Tyr	Cys	Gly
gef.:	0.27	0.26	0.83	0.54	0.62	1.27	1.34	-	1.25
Theorie:	1	1	3	2	2	2	2	1	2

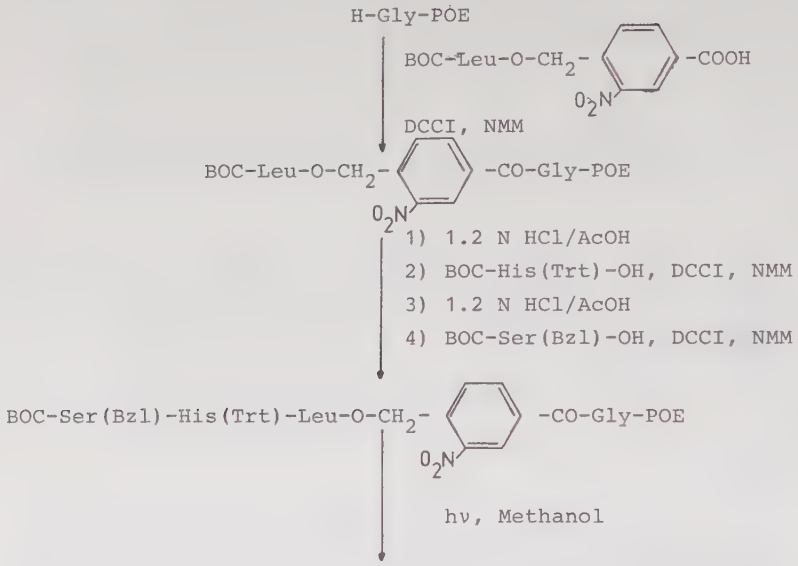
	Arg	Phe	Thr	Pro	Lys
gef.:	0.98	1.66	1.00	1.04	1.11
Theorie:	1	2	1	1	1

Durch genaueres Betrachten der Aminosäurezusammensetzung erkennt man das Vorliegen kürzerer Peptide neben größeren Bruchstücken. Als Reinigungsoperationen boten sich an:

A. Säulenchromatographie an Kieselgel

Wichtige Voraussetzung dafür ist die gute Löslichkeit in Lösungsmitteln wie z.B. Methanol, Chloroform etc. Eine gute Löslichkeit einer solchen Sequenz hängt sehr entscheidend von den Schutzgruppen und den Aminosäuren sowie deren Reihenfolge ab. Mit den Erkenntnissen, die bei den Photolysen der kürzeren Peptide erarbeitet wurden, konnte die sichere Stabilität aller Schutzgruppen, mit Ausnahme der Trt-Gruppe, garantiert werden. Da eine Abspaltung der Tritylschutzgruppe mit Sicherheit eine drastische Veränderung der Eigenschaften des Peptids erbringen würde, mußte deren Stabilität zuerst bewiesen werden.

Dazu wurde folgende Synthese durchgeführt:

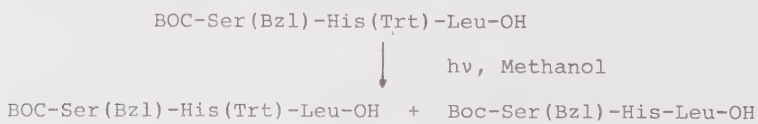


BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH + BOC-Ser(Bzl)-His-Leu-OH

(80) : (20)

Mengenverhältnis

Die Abspaltung der Trt-Gruppe wird zum Teil durch 1.2 N HCl/AcOH und zum Teil durch die Bestrahlung bewirkt. Der Effekt der reinen Bestrahlung läßt sich durch die Untersuchung am klassisch hergestellten Tripeptid ermitteln:



BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH + Boc-Ser(Bzl)-His-Leu-OH

(95) : (5)

Mengenverhältnis

Aus diesen Versuchen ließ sich für die Tritylgruppe eine 95 %-ige Stabilität während der Photolyse ermitteln. Das bedeutet, daß durch den stark lipophilen Einfluß der Tritylgruppe eine günstige Löslichkeit des Peptids resultiert. Zudem ergeben sich nur geringe Verluste an N^{im}-ungeschütztem Peptid, das bei der Kieselgelchromatographie ein anderes Laufverhalten zeigt.
An der Kieselgelsäule wurde das Dokosapeptid zuerst eluiert, da Kieselgel einen schwachen Geleffekt besitzt und andererseits das vollgeschützte Peptid im selben Laufmittel auf der Dünnschichtplatte den größten R_F-Wert zeigt. Die so isolierten Fraktionen waren reine, polymerfreie Peptidfraktionen. Die Zusammensetzung der Dokosapeptidfraktion hatte sich bereits stark verbessert.

	Ser	His	Leu$^+$	Val$^+$	Glu	Ala	Tyr	Cys	Gly
gef.:	0.85	0.74	2.1	1.1	1.58	1.35	1.96	-	1.63
Theorie:	1	1	3	2	2	2	2	1	2

	Arg	Phe	Thr	Pro	Lys
gef.:	0.89	1.65	1.00	1.00	1.13
Theorie:	1	2	1	1	1

$^+$Hydrolyseresistenz Leu-Val und Val-Cys(SiP)

B. Gelchromatographie

Durch den Einsatz einer LH 20-Säule ließ sich das geschützte Dokosapeptid rein herstellen. Das Peptid wurde durch eine Aminosäureanalyse charakterisiert. Durch Variation der Hydrolysezeiten wurde so versucht, die Hydrolyseresistenz von Leu-Val und Val-Cys(SiP) zu beseitigen. Selbst bei 72 Stunden war jedoch der Gehalt an Valin und Leucin etwas zu nieder. Dem Endprodukt kommt folgende Zusammensetzung zu:

	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Tyr	Cys	Gly
gef.:	0.90	0.73	2.62	1.65	2.05	1.72	1.97	-	2.01
Theorie:	1	1	3	2	2	2	2	1	2

	Arg	Phe	Thr	Pro	Lys
gef.:	1.48	2.10	1.00	1.03	0.99
Theorie:	1	2	1	1	1

Der etwas zu gering erscheinende Histidinwert ist nicht erklärbar, da Histidin im gekuppelten Tripeptidfragment vergleichsweise zum Serin sogar einen etwas höheren Wert ergab. Eine Begründung kann nicht auf die Tritylgruppe bzw. deren photolytische Abspaltung geschoben werden. Das Problem der N^{im}-Trt-Photolyse wurde am klassisch hergestellten Tripeptid BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH abgehandelt. Die Aminosäureanalyse erbrachte vor und nach der Bestrahlung dasselbe Ergebnis.

Bei der gelchromatographischen Reinigung des Dokosapeptids wurden Rumpfsequenzen isoliert. Es handelt sich dabei um die C-terminalen Peptide B_{22-30} und B_{23-30}. Die Probleme beim Umsetzen mit BOC-Arg(Mbs)-OH werden hier nochmals verdeutlicht.

Aufgrund der guten Löslichkeit kann im Falle des Dokosapeptids durch eine geschickte Kombination von Kieselgel- und Gelchromatographie eine Abtrennung dieser Rumpfsequenzen erfolgen. Durch das Aufbauprinzip der zweifachen Kupplungs- und Acetylierungsschritte konnte das Dokosapeptid sicher aufgebaut werden und dabei die Entstehung weiterer Rumpf- und Fehlsequenzen ausgeschlossen werden. Der Einsatz der Fragmentkupplung eines Tripeptids mit dem Nonadekapeptidpolymer ließ sich wirkungsvoll demonstrieren.

Schutzgruppenabspaltung

Da das Dokosapeptid in geschützter Form isoliert werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß sich durch die Behandlung mit HF und eine anschließende Ionenaustauschchromatographie das freie, jedoch noch am Cystein geschützte Peptid isolieren lassen sollte. Als Säulenmaterial kam SP-Sephadex zum Einsatz, da es sich bei dem Peptid um ein sehr wenig basisches Produkt handelt. Die Versuche, das freie Peptid auf diese Weise zu isolieren, schlugen fehl. Hierfür kann als Begründung angeführt werden, daß aus den 35 mg geschütztem Peptid substanzmäßig zu wenig sauberes, freies Dokosapeptid erhalten werden kann, zumal sich bei der Freisetzung des ungeschützten Peptids der Einfluß der HF-Behandlung negativ auf die Ausbeuten auswirken kann. Dies läßt sich durch die Vergleichszahlen bei der Herstellung des Nona- und des Undekapeptids verdeutlichen. Beim Nonapeptid lag die Ausbeute der HF-Reaktion bei 50 %, beim Undekapeptid dagegen nur noch bei 40 %.

5.7. Photolyse der polymergebundenen Insulin-B-Kette

Die photolytische Abspaltung der polymergebundenen Insulin-B-Kette konnte in DMSO erfolgreich durchgeführt werden. Die Abtrennung vom Träger ließ sich analog zum geschützten Dokosapeptid durchführen. Obwohl das geschützte Triakontapeptid im Umkristallisationsmedium Methanol/DMSO nicht gut löslich ist, ließ sich die Isolierung des Peptids auf diese Art erreichen. Der Grad der Abtrennung konnte mit der Löslichkeit des abgespaltenen POE korreliert werden. Zu Beginn des Trennungsganges ist das Rohmaterial sehr schlecht in Methylenchlorid löslich, wogegen am Ende das POE sehr gut löslich vorliegt und praktisch keine Eigenschaften des Peptidpolymers mehr besitzt. Durch die anschließende Aminosäureanalyse des POE wurde der Abspaltungsgrad zu 80 % bestimmt.

Das geschützte Peptid ließ sich aufgrund seines Löslichkeitsverhaltens nicht weiter reinigen und mußte samt der anhaftenden Rumpfsequenzen sowie der polymeren Rückstände mit HF behandelt werden. Die Reinigung des isolierten Materials ließ sich weder über eine CM-Sephadex noch über eine SP-Sephadex-Säule durchführen. Da im Vergleich zum Dokosapeptid wesentlich ungünstigere Verhältnisse für das Erreichen des Ziels, der Insulin-B-Kette, vorlagen, mußten die Reinigungsversuche an diesem Punkt beendet werden. Nur wenn es gelingen sollte, das geschützte Peptid in angemessener Form zu reinigen, kann der eingeschlagene Weg zu einem guten Ergebnis führen.

5.8. Diskussion

Der Aufbau der Insulin-B-Kette nach der Liquid-Phase-Methode läßt sich nur durch eine weitere Optimierung der eingesetzten Aminosäurederivate durchführen. So konnte hier gezeigt werden, daß Probleme bei der Kupplung des Arginins und der Sequenz Asn-Gln-His das Endergebnis so weit verschlechtern, daß eine wirkungsvolle Reinigung des Peptids am Ende nicht mehr erreicht werden konnte.

Dagegen waren die Synthesen der Fragmente erfolgreich. Das geschützte Nona- und Undekapeptid konnte durch Photolyse in guten Ausbeuten vom polymeren Träger abgespalten werden. Durch chromatographische Reinigungsschritte ließ sich in beiden Fällen ein sauberes Produkt herstellen. Die eingesetzten Schutzgruppen wurden bei der photolytischen Abspaltung nicht abgetrennt, sodaß die Peptide vollgeschützt isoliert wurden. Dies trifft in besonderem Maß auch für das C-terminale Dokosapeptid der Insulin-B-Kette zu, sodaß hier die Möglichkeit gegeben wird, große Fragmente mit optimalem Schutz der Drittfunktionen zu synthetisieren. Dies ist insofern interessant, daß jetzt durch klassische

Fragmentkupplungen große Peptide aufgebaut werden können. Bei der Synthese des 22-iger Peptids lassen sich auch die Vorteile einer Fragmentkupplung am polymeren Träger beweisen, sodaß letztlich die Herstellung des vollgeschützten Dokosapeptids nur über den Einsatz des Tripeptids gelingen konnte.

Die Abspaltung der Drittfunktionen ließ sich mit Fluorwasserstoff durchführen. Jedoch waren die Ausbeuten bei dieser Reaktion nicht sehr überzeugend, zumal bei den größer werdenden Peptiden eine zunehmende Verschlechterung der Ausbeuten zu verzeichnen war. So ließ sich das Nona- und Undekapeptid durch eine anschließende Ionenaustauschchromatographie sehr rein herstellen. Die Trennleistungen der eingesetzten Säulen waren so hoch, daß sich der Gehalt an Rumpf- und Fehlsequenzen ermitteln ließ. Bei den anschließenden Reinheitsuntersuchungen der Peptide fiel auf, daß die D-Anteile der individuellen Aminosäuren sehr gering waren. Das Auftreten sehr geringer Razemisierungsanteile kann als großer Vorteil der Liquid-Phase-Methode und der photolytischen Abspaltung gewertet werden.

Aus den durchgeführten Reaktionsschritten am POE kann gefolgert werden, daß Peptide bis zu einer Größe von ca. 20 Aminosäuren relativ einfach nach dieser Methode aufgebaut werden können. Natürlich hängt dies auch von den eingesetzten Aminosäuren bzw. von deren Derivaten und der Sequenz ab. Die Umsetzung kann in Lösungsmitteln wie Methylenchlorid, DMF und DMSO ausgeführt werden, und die Reaktion kann auch mit dem Fluramtest sicher verfolgt werden. Dann tritt jedoch bei zunehmender Kettenlänge, besonders bei hohen Beladungsgraden, eine zunehmende Verschlechterung der Lösungseigenschaften auf. Dies ließ sich auch bei der Synthese der Insulin-B-Kette beobachten.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

1. Abkürzungen, allgemeine Arbeitsvorschriften, Geräte und Chemikalien

1.1. Abkürzungen

Für die Dünnschichtchromatographie werden folgende Laufmittel benutzt:

(A) Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1)
(B) Chloroform/Methanol/Essigester (65:25:10)
(C) Methylenchlorid/Methanol (9:1)
(D) Chloroform/Methanol/Essigester/Essigsäure (65:25:9:1)
(E) Methylenchlorid/Methanol (7:3)
(F) Chloroform/Methylenchlorid/Methanol (2:1:1)
(G) Methylenchlorid/Methanol (1:1)

AcOH	Essigsäure
AS	Aminosäure
ASA	Aminosäureanalyse
CD	Circular-Dichroismus
CT	Chlor-Tolidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DIPEA	Diisopropylethylamin
EE	Essigester
NMM	N-Methylmorpholin
min	Minute
POE	Poly(oxyethylen)
Std	Stunde
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran

Die Abkürzungen der Aminosäuren und der Schutzgruppen erfolgte nach den Empfehlungen der IUPAC-IUB-Kommission (121,122).

1.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

Aminosäureanalyse

Etwa ein Mikromol Peptid oder Polymerpeptid wird in eine Glasampulle genau eingewogen und mit 3 ml 6 N HCl sowie einem Kristall Phenol versetzt. Bei großen, geschützten Peptiden, vor allem wenn sie an POE gebunden sind, wird ein Volumenanteil reine AcOH zugesetzt. Die Ampulle wird zugeschmolzen und 24 Std. bei 120°C gehalten. Anschließend wird die Lösung im Vakuum bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wird nach Spackman et al. analysiert (123).

Razemisierungstest

Die Prüfung auf Razemisierung erfolgt gaschromatographisch (88). Die Proben werden hierzu wie für die Aminosäureanalyse vorbereitet. Das trockene Hydrolysat wird in 0.5 ml 1.2 N HCl/Propanol aufgenommen und eine Std. bei 110°C verestert. Das Lösungsmittel wird mit Stickstoff abgeblasen. Die Acylierung der Aminosäuren wird mit 100 Mikroliter Pentafluorpropionsäureanhydrid in 0.5 ml Methylenchlorid während 10 min. bei 110°C durchgeführt. Das Lösungsmittel wird mit Stickstoff abgeblasen. In einer mit Chirasil-Val beschichteten Glaskapillarsäule werden die flüchtigen Aminosäurederivate in ihre Enantiomeren aufgetrennt und quantitativ erfaßt.

1.3. Geräte und Instrumente

- Mikrodosimat mit pH-Meter E 512, Impulsdosimat E 473 der Firma Metrohm Herisau, Schweiz
- Perkin-Elmer Polarimeter Modell 241
- Carlo-Erba Gaschromatograph Modell 2101
- ^{1}H-NMR 90 MHz Bruker Spektrometer
- IR-Spektrometer Perkin-Elmer Modell 281 B
- Aminosäureanalysator Biotronik LC 6000 E
- UV-Lampe UVIS von Desaga für 254/366 nm und Tageslichtvisualisation
- Schmelzpunktsbestimmungsapparatur nach D. Tottoli der Firma Büchi, Schweiz
- Fraktionssammler mit optischer Einheit UA 5 ISCO und 328 ISCO
- Fraktionssammler LKB 7000 Ultrorac mit optischer Einheit Uvicord II und III
- Dünnschichtelektrophoreseapparatur der Firma Camag
- CD-Spektrometer Dichrographe II, Roussel Jouan, Paris
- Massenspektrometer Varian Mat 711
- Zeiss-Spektralphotometer PMQ II

1.4. Chemikalien, Lösungsmittel und Reagentien

Diethylether wird mit Natriumdispersion in Paraffin absolutiert und destilliert.
Methylenchlorid wird über Kaliumcarbonat destilliert.
DMF wird zweimal destilliert: 500 ml DMF werden 1 Std. mit Calciumhydrid gekocht und rasch im Wasserstrahlvakuum unter Lichtausschluß destilliert; die zweite Destillation erfolgt in Gegenwart von Ninhydrin.
Essigsäure wird über P_4O_{10} getrocknet, abfiltriert und anschließend destilliert.
1.2 N HCl/AcOH bildet sich beim Einleiten von HCl-Gas in Essigsäure. 1000 g Essigsäure nehmen hierbei 42 g HCl-Gas auf.

Methanol wird mit Magnesium absolutiert und destilliert. Trifluoressigsäure wird in Gegenwart von konz. Schwefelsäure destilliert. Zu 500 ml Trifluoressigsäure gibt man 2 ml Schwefelsäure.
Dimethylsulfoxid stammte von der Firma Merck und wurde über Molekularsieb 4 Å aufbewahrt.
Polyethylenglykol stammte von den Chemischen Werken Hüls, Marl.
Die verwendeten Aminosäuren wurden von Ajinomoto CO., Inc., Tokyo, Japan bezogen.
Zur Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} der Firma Merck benutzt.
Zur Dünnschichtelektrophorese wurden Cellulose-Fertigplatten der Firma Merck benutzt.

Ninhydrinlösung (124,125)

Eine Lösung von 600 mg Ninhydrin in 200 ml n-Butanol und 6 ml Essigsäure. Das Chromatogramm wird mit dieser Lösung besprüht. Bei 120°C ergeben freie, primäre Aminogruppen nach 2 min., und BOC-geschützte, primäre Aminogruppen nach 10 min. eine rot-violette Färbung.

Chlor-Tolidin-Test (126,127)

80 mg o-Tolidin, 15 ml Eisessig und 0.5 g KJ werden mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt. Das getrocknete Chromatogramm wird mit elementarem Chlor 2 min. lang begast. Das Chlor wird von der Platte vertrieben, anschließend wird das Chromatogramm durch Besprühen mit der Lösung sichtbar. Ein positiver Test ist durch blaue, in hoher Konzentration gelb-orange Anfärbung gekennzeichnet.

Fluramtest (50)

Man verwendet eine 0.05 %-ige Lösung von Fluram-Roche in Aceton. Das getrocknete Chromatogramm wird mit 5 %-iger

$NaHCO_3$-Lösung und anschließend mit Reagens besprüht. Freie, primäre Aminogruppen zeigen bei 366 nm eine charakteristische, konzentrationsabhängige Fluoreszenz.

Dragendorff-Bürger-Reagens (128,129)

a) 1.7 g basisches Wismutnitrat werden in 20 ml Eisessig gelöst. Nach Zusatz von 80 ml Wasser, einer Lösung von 40 g KJ in 100 ml Wasser und 200 ml Eisessig wird mit Wasser auf 1000 ml verdünnt.

b) Bariumchlorid (20 % in Wasser)

Vor Gebrauch werden 2 Vol. a) und 1 Vol. b) gemischt. POE ergibt mit dem Reagens nach Besprühen eine intensive orangerote Färbung.

Paulys-Reagens (130,131)

Dies ist diazotierte Sulfanilsäure zum Nachweis für Phenole, kupplungsfähige Amine und Heterocyclen.

a) 4.5 g Sulfanilsäure werden in 45 ml 12 N Salzsäure unter Erwärmen gelöst und die Lösung mit Wasser auf 500 ml verdünnt.

b) Eine 4.5 %-ige Natriumnitritlösung in Wasser.

c) Eine 10 %-ige Natriumcarbonatlösung in Wasser.

Gleiche Volumina von a) und b) werden kurz vor dem Besprühen der Platte gemischt. Das Chromatogramm wird hiermit besprüht, anschließend mit dem Föhn getrocknet und mit Lösung c) besprüht. Eine positive Reaktion zeigt sich durch die Entstehung orange-roter Flecken.

2. Herstellung der Ausgangsverbindungen

2.1. Darstellung der Aminosäurederivate

BOC-Azid wurde nach der Methode von L. Carpino hergestellt (132,133).
Nach der pH-Stat-Methode von E. Schnabel (85) wurden folgende BOC-Aminosäuren hergestellt:

BOC-Ala, BOC-Asn, BOC-Gln, BOC-Glu(Bzl)-OH, BOC-Gly, BOC-Leu, BOC-Lys(o-BrZ)-OH, BOC-Phe, BOC-Pro, BOC-Ser(Bzl)-OH und BOC-Val.

Von den trifunktionellen Aminosäuren wurden folgende Derivate hergestellt:

H-Cys(SiP)-OH (93), H-Glu(Bzl)-OH (99,134), H-Lys(o-BrZ)-OH (96), H-Thr(Bzl)-OBzl (97), H-Tyr(o-ClZ)-OH (56); H-Ser(Bzl)-OH wurde käuflich erworben (Firma Fluka AG, Buchs).

Desweiteren wurden dargestellt:

BOC-Cys(SiP)-OH (93), BOC-Thr(Bzl)-OH (97), BOC-Tyr(o-ClZ)-OH (56,86), BOC-His(BOC)-OH (135), H-His-OMe x 2 HCl (136), H-His(Trt)-OMe x HCl (101,102).

Alle eingesetzten Aminosäurederivate wurden einer dünnschichtchromatographischen Reinheitskontrolle unterzogen. Die Schmelzpunkte und Drehwerte der dargestellten Verbindungen stimmten, sofern nicht ausdrücklich vermerkt, mit den Literaturdaten überein.

2.2. L-Leucinmethylesterhydrochlorid (3)

Man tropft unter Rühren 15.8 ml (0.22 Mol) $SOCl_2$ zu 60 ml (1.56 Mol) Eis-Kochsalz gekühltem Methanol und trägt hier-

auf 26.2 g (0.2 Mol) Leucin ein. Die Temperatur darf -5°C nicht überschreiten. Hierauf wird langsam auf 40°C erwärmt und 2 Std. bei dieser Temperatur gerührt. Das Leucin geht während dieser Zeit langsam in Lösung. Man destilliert das Methanol im Vakuum ab und trocknet anschließend 30-40 min. bei 12 Torr und 60°C.

Das rohe H-Leu-OMe x HCl wird in Wasser gelöst und an der Glaselektrode mit konz. Ammoniak auf pH 8.5 gebracht. Man extrahiert mit 250 ml Diethylether und wäscht die organische Phase 3-4 mal mit 15 ml Wasser. Es wird mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abfiltrieren des Trockenmittels gibt man 150 ml $HCl_{konz.}$/Ether hinzu. Das H-Leu-OMe x HCl fällt hierbei in schönen Nadeln hochrein aus. Das Produkt wird abgesaugt, mit Ether nachgewaschen und im Vakuum über P_4O_{10} getrocknet.

Ausbeute: 23.2 g (64 %) (Lit.: 83-86 %, Reinigung durch Destillation)

Schmelzpunkt: 150°C (Lit.: 151-151.5°C)

Reinheitskontrolle: DC R_F = 0.56 (A)
Ninhydrin +
CT +

2.3. BOC-His(Trt)-OH (102)

2.7 g (10 mMol) BOC-His-OMe x HCl (98,137,138) und 2.8 g (10 mMol) Tritylchlorid werden in 30 ml Methylenchlorid gelöst und gerührt. Als Base werden 1.7 ml DIPEA zugesetzt. Nach 3 Std. gibt man weitere 0.7 ml DIPEA hinzu. Nach Ablauf von 3.5 Std. wird am Rotationsverdampfer einrotiert und das ölige Rohprodukt in Essigester aufgenommen. Man extrahiert mit verd. HCl, anschließend mit Kochsalzlösung und trocknet die organische Phase über Natriumsulfat. Nach Abfiltrieren und Abziehen des Lösungsmittels erhält man in quantitativer Ausbeute 5.1 g BOC-His(Trt)-OMe

(R_F = 0.78; B) in Form eines farblosen Schaumes. Dieses Produkt wird zur Verseifung der Esterbindung in 50 ml Dioxan/Wasser (3:1) gelöst und langsam mit 10 ml 1 N NaOH-Lösung versetzt. Das Reaktionsende wird durch DC festgestellt. Man neutralisiert mit 0.5 N Salzsäure und entfernt das Dioxan am Rotationsverdampfer. Das Öl wird in Essigester aufgenommen und mit verd. Salzsäure angesäuert. Die organische Phase wird mit Kochsalzlösung neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Essigester wird abgezogen und das verbleibende Öl in Methylenchlorid gelöst. Das Produkt wird mit Petrolether 30/50 gefällt, abgesaugt und im Hochvakuum über P_4O_{10} getrocknet.

Ausbeute: 4.1 g (82 %)

Schmelzpunkt: 108-113°C (Lit.: 113°C, 102)

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = + 11.8° (c = 1, EtOH)

Lit.: $[\alpha]_D^{20}$ = + 5.9° (102)

Reinheitskontrolle: DC R_F = 0.34
Ninhydrin +
CT +
Pauly -

2.4. BOC-Arg(Mbs)-OH (47)

Z-Arg-OH wird nach (139) hergestellt. Die Einführung der Guanidino-Schutzgruppe erfolgt nach (113).

H-Arg(Mbs)-OH

16.3 g (24.25 mMol) Z-Arg(Mbs)-OH x DCHA werden mit 25 ml 1 N Schwefelsäure zur Freisetzung der Carboxylgruppe umgesetzt. Durch Extraktion mit Essigester erhält man 12.7 g öliges Produkt, das in Essigsäure gelöst wird und mit soviel 33 %-iger HBr/AcOH versetzt wird, daß eine etwa 25 %-ige HBr/AcOH-Lösung vorliegt. Man rührt den Ansatz 45 min.

bei Raumtemperatur und schüttet die Lösung dann in 1.2 l gekühlten abs. Ether. Der Niederschlag wird abgesaugt und mit Ether gewaschen. Das Rohprodukt wird in 30 ml Methanol/ 30 ml Eisessig gelöst und durch Eintropfen in 1 l kalten abs. Ether zur Kristallisation gebracht. Man saugt ab, wäscht mit Ether nach und trocknet im Hochvakuum über P_4O_{10}.

Ausbeute: 9.6 g (93 %) (Lit.: 48 %, 47)

Reinheitskontrolle: DC R_F = 0.18 (A)
Ninhydrin +
UV +
CT +

BOC-Arg(Mbs)-OH

Die Einführung der N^{α}-Schutzgruppe erfolgt nach (47).

3. Darstellung der 4-[N-(tert.-Butyloxycarbonyl)amino-acyloxymethyl]-3-nitrobenzoesäuren (65,66)

3-Nitro-4-brommethylbenzoesäure-tert.-butylester (= A) (140)

31.5 g (0.12 Mol) 3-Nitro-4-brommethylbenzoesäure (27) werden in einer Druckflasche in 150 ml Chloroform suspendiert und mit 150 ml fl. Isobuten unter Druck umgesetzt (134,141). Als Katalysator werden 1.2 ml konz. Schwefelsäure zugesetzt und der Ansatz so lange gerührt, bis eine klare Lösung entstanden ist. Nach 2-3 Tagen ist die Reaktion beendet. Das Isobuten wird abgeblasen. Die organische Phase wird mehrfach mit konz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Entfernung des Lösungsmittels erhält man ein gelbes Öl, das rasch auskristallisiert. In Tab. 5 (Seite 70) sind die physikalischen und chemischen Daten gesammelt.

4-[N-(tert.-Butoxycarbonyl)aminoacyloxymethyl]-3-nitrobenzoesäuren-tert.-butylester (= B)

Allgemeine Arbeitsvorschrift:
30 mMol der BOC-geschützten Aminosäurecäsiumsalze werden mit 6.32 g (20 mMol) 3-Nitro-4-brommethylbenzoesäure-tert.-butylester bei 50°C in 100 ml DMF zur Reaktion gebracht. Sobald die anfängliche, intensive Rotfärbung verschwunden ist (20-60 min., Tab. 5) wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer am Ölpumpenvakuum bei 0.5 Torr und 40°C abgezogen. Der Rückstand wird in Essigsäureethylester gelöst, viermal mit konz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und mit Kochsalz-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abziehen des Lösungsmittels werden die Produkte meist als Öle erhalten. Bei Ala, Asn, Gln und Ser(Bzl) werden kristalline Produkte erhalten, die aus Diisopropylether/Petrolether umkristallisiert werden. Die Daten der Produkte sind in Tab. 5 gesammelt.

4-(Aminoacyloxymethyl)-3-nitrobenzoesäuren (= C)

20 mMol der Substanzen B werden zur Abspaltung der Amino- und Carboxylschutzgruppen in 100 ml 1.2 N HCl/AcOH 2 Std. gerührt. Die Reaktion kann dabei dünnschichtchromatographisch verfolgt werden. Das Abspaltungsreagens wird am Rotationsverdampfer abgezogen, und Spuren durch Abziehen von Methylenchlorid entfernt. Die Rohprodukte werden in abs. Aceton aufgeschlämmt und 1 Std. gerührt. Nach dem Abfiltrieren erhält man so reinweiße, scharfschmelzende und DC-reine Produkte. Die Ausbeuten liegen zwischen 70 und 87 %. Durch Rückgewinnung von nicht umgesetztem Ausgangsprodukt nach Aufarbeitung der Filtrate und wiederholte Abspaltung kann die Reaktion nahezu quantitativ ausgeführt werden.

Wird anstelle der HCl/AcOH Trifluoressigsäure in Methylenchlorid eingesetzt, so ist die Reaktion nach 70 min. beendet. Nach Abziehen des Abspaltungsreagens erhält man so

jedoch Öle, die sich einer Kristallisation hartnäckig widersetzen. Eine erfolgreiche Kristallisation kann mit Diisopropylether, Diethylether oder Aceton erreicht werden.

4-[N-tert.-Butoxycarbonyl)aminoacyloxymethyl]-3-nitrobenzoesäuren (= D)

Für die Einführung der Aminoschutzgruppe stehen zwei Methoden zur Wahl.

Methode 1: (86)

20 mMol der Substanzen C werden in 100 ml DMSO eingetragen, mit 10.2 ml (60 mMol) DIPEA und 5.7 ml (40 mMol) BOC-Azid versetzt. Der Ansatz wird bei Raumtemperatur unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Nach 2 Std. gibt man nochmals 4 ml DIPEA hinzu und läßt die Reaktion 24 bis 48 Std. laufen. Dann wird mit 200 ml Wasser verdünnt und zweimal mit Ether extrahiert. Dadurch wird DIPEA und überschüssiges BOC-Azid entfernt. Die wässrige Phase wird mit Eis gekühlt und mit 4 N Salzsäure auf pH 2 gebracht. Das Produkt wird durch viermaliges Extrahieren mit Essigester isoliert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumchlorid-Lösung neutral gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels werden die Rohprodukte aus Ether/Petrolether oder Aceton/Petrolether gefällt. Bei schlecht kristallisierenden Endprodukten werden die Dicyclohexylammoniumsalze hergestellt.

Abweichend hiervon wird die Glutaminverbindung hergestellt. Beim Ansäuern der wässrigen Phase fällt der BOC-Gln-(4-carboxy-2-nitro)benzylester kristallin aus. Aufgrund seiner Schwerlöslichkeit kann eine Extraktion mit Essigester nicht durchgeführt werden. Deshalb wird das Produkt abfiltriert und aus DMF/Methanol umkristallisiert.
Weitere Daten sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Methode 2: (87)

15 mMol Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylester werden in 35 ml DMF gelöst und mit 15 mMol (= 2.6 ml) DIPEA versetzt. Man gibt 3.6 g (17.25 mMol) Di-tert.-Butylpyrocarbonat hinzu und rührt die Reaktionslösung unter Feuchtigkeitsausschluß. Die Umsetzung kann dabei mit DC verfolgt werden. Nach etwa 45 min. Reaktionszeit wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer mit Hilfe einer Ölpumpe abgezogen. Essigesterlösliche Produkte werden in Essigsäureethylester aufgenommen und mit einer 5 %-igen $KHSO_4$-Lösung angesäuert. Die organische Phase wird mit einer Kochsalz-Lösung neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels können die Produkte durch Umfällen aus Ether/Petrolether oder Aceton/Petrolether gereinigt werden.

Tab. 5: Zusammengefaßte Daten der BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzylester

Verbindung	Ausbeute %	Schmelzpkt. °C	R_F	Elementaranalyse	Reaktionszeit
A	94	63-64 Lit.: 64	0.87 (C)	$C_{12}H_{44}NO_4Br$ (316.14) ber.: C 45.66; H 4.43 N 4.43; Br 25.31 gef.: C 46.11; H 4.74 N 4.55; Br 25.37	
B (Gly)	90	Öl	0.78 (C)	$C_{19}H_{26}N_2O_8$ (410.4) ber.: C 55.60; H 6.38 N 6.82 gef.: C 55.73; H 6.42 N 6.90	40 min.
B (Ala)	75	118	0.90 (C)	$C_{20}H_{28}N_2O_8$ (424,45) ber.: C 56.60; H 6.65 N 6.60 gef.: C 57.01; H 6.72 N 6.52	60 min.

Fortsetzung der Tabelle 5

B(Val)	94	Öl	0.86 (C)	$C_{22}H_{32}N_2O_8$ (452.51) ber.: C 58.40; H 7.13 N 6.19 gef.: C 58.42; H 6.85 N 5.90	30 min.
B (Leu)	94	Öl	0.88 (C)	$C_{23}H_{34}N_2O_8$ (466.54) ber.: C 59.22; H 7.35 N 6.00 gef.: nicht bestimmt	30 min.
B (Asn)	88	65-67	0.66 (C)	$C_{21}H_{29}N_3O_9$ (467.47) ber.: C 53.96; H 6.21 N 8.99 gef.: C 54.09; H 6.47 N 8.20	20 min.
B (Gln)	72	69-70	0.66 (D)	$C_{22}H_{31}N_3O_9$ (481.51) ber.: C 54.87; H 6.50 N 8.73 gef.: C 53.82; H 6.70 N 8.40	40 min.
B (Ser)	87	118	0.90 (B)	$C_{27}H_{34}N_2O_9$ (530.58) ber.: C 61.12; H 6.46 N 5.28 gef.: C 61.57; H 6.92 N 5.32	45 min.

Fortsetzung der Tabelle 5

Verbindung	Ausbeute %	Schmelzpkt. °C	R_F	Elementaranalyse %	$[\alpha]_D^{23}$	D-Isomer % (unkorr.)	Reaktionszeit
B (Glu)	99	Öl	0.90 (B)	$C_{29}H_{36}N_2O_{10}$ (572.6) ber.: C 61.04; H 6.56 N 4.69 gef.: C 60.83; H 6.33 N 4.89			45 min.
B (Thr)	94	Öl	0.88 (C)	$C_{28}H_{36}N_2O_9$ (544.61) ber.: C 61.75; H 6.66 N 5.14 gef.: C 62.03; H 7.00 N 5.05			40 min.
D (Gly)	54	159-160	0.70 (A) 0.73 (E)	$C_{15}H_{18}N_2O_8$ (354.3) ber.: C 50.85; H 5.12 N 7.82 gef.: C 51.47; H 4.89 N 7.82	-	-	24 Std. Methode 1
D (Ala)	92	126	0.39 (F)	$C_{16}H_{20}N_2O_8$ (368.35) ber.: C 52.17; H 5.47 N 7.60 gef.: C 51.63; H 5.28 N 7.26	- 9.82° (c=1; EtOH)	1.5	24 Std. Methode 1

Fortsetzung der Tabelle 5

Verbindung	Ausbeute %	Schmelzpkt. °C	R_F	Elementaranalyse %	$[\alpha]_D^{23}$	D-Isomer % (unkorr.)	Reaktionszeit
D (Val)	83	103-105	0.69 (G)	$C_{18}H_{24}N_2O_8$ (396.4) ber.: C 54.54; H 6.06 N 7.07 gef.: C 54.66; H 6.41 N 7.02	-4.47° (c=1; EtOH)	0.5	36 Std. Methode 1
D (Leu)	92 (72.1 als DCHA-Salz)	Öl (78-79, DCHA-Salz)	0.52 (B) 0.87 (A)	$C_{19}H_{26}N_2O_8$ (410.4) DCHA: $C_{31}H_{49}N_3O_8$ (591.75) ber.: C 62.92; H 8.35 N 7.10 gef.: C 62.68; H 8.50 N 6.96	DCHA: -14.6° (c=1,MeOH) +5.9° (c=1, $CHCl_3$)	0.5	24 Std. Methode 1
D (Asn)	30	159	0.57 (E)	$C_{17}H_{21}N_3O_9$ (411.36) ber.: C 49.64; H 5.11 N 10.22 gef.: C 49.28; H 5.16 N 9.96	-13.2° (c=1, DMF)	2.5	48 Std. Methode 1
D (Gln)	73	206	0.47 (D) 0.74 (A)	$C_{18}H_{23}N_3O_9$ (425.4) ber.: C 50.82; H 5.45 N 9.88 gef.: C 50.77; H 5.53 N 9.75	-4.79° (c=1, DMSO)	0.89	36 Std. Methode 1

Fortsetzung der Tabelle 5

Verbindung	Ausbeute %	Schmelzpkt. °C	R_F	Elementaranalyse %	$[\alpha]_D^{23}$	D-Isomer % (unkorr.)	Reaktionszeit
D (Ser)	83	134-136	0.56 (D) 0.85 (A)	$C_{23}H_{26}N_2O_9$ (470.5) ber.: C 58.72; H 5.57 N 5.95 gef.: C 58.69; H 5.23 N 5.81	-16.1° (c=1, MeOH)	0.6	45 min. Methode 2
D (Glu)	80	127	0.62 (D) 0.86 (A)	$C_{25}H_{38}N_2O_{10}$ (515.5) ber.: C 58.25; H 5.48 N 5.43 gef.: C 58.01; H 5.51 N 5.23	-5.6° (c=1, MeOH)	1.4	45 min. Methode 2
D (Thr) DCHA-Salz	20	139	0.32 (C) 0.82 (A)	$C_{40}H_{59}N_3O_9$ (725.95) ber.: C 66.18; H 8.19 N 5.79 gef.: C 66.21; H 8.04 N 5.89	-1.76° (c=1,EtOH)	0.5	40 Std. Methode 1

4. Synthese des Rinderinsulinfragments B_{22-30} (59)

4.1. Vorbereitung des Polymers zum Peptidaufbau

4.1.1. Veresterung von POE_{15000} mit BOC-Gly

5.25 g (30 mMol) BOC-Gly werden in 30 ml Methylenchlorid gelöst, im Eisbad auf 0°C gekühlt, mit 7.5 ml 2 N DCCI-Lösung versetzt und eine Std. gerührt. Danach wird noch eine Std. bei Raumtemperatur gerüht, vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, und das Filtrat in eine Lösung von 45 g (6 mMol OH-Gruppen) POE in 200 ml Methylenchlorid gegeben. Als Base werden 3 g DMAP zugesetzt. Die Reaktionslösung wird nun unter Feuchtigkeitsausschluß drei Tage bei 40°C gerührt, danach mit der gleichen Menge an Aktivkomponente als auch Base versetzt und weitere drei Tage gerührt. Das veresterte Polymer wird jetzt aus der Lösung mit Diethylether gefällt und durch zweimaliges Umfällen aus Methylenchlorid/Ether gereinigt. Das nunmehr dünnschichtchromatographisch reine Produkt (R_F = 0.0, A) wird über P_4O_{10} im Hochvakuum getrocknet. Die Aminosäureanalyse erbrachte einen Veresterungsgrad von 98 %.

4.1.2. Einführung der C-terminalen Aminosäure

Nach der Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit 1.2 N HCl/AcOH werden 40 g (5.2 mMol Aminogruppen) H-Gly-Polymer in 200 ml Methylenchlorid gelöst und mit 6 g (16 mMol) BOC-Ala-(4-carboxy-2-nitro)benzylester versetzt. Man gibt 8 ml 2 N DCCI-Lösung hinzu und rührt 15 min. bei Raumtemperatur, wonach dann 5.5 ml NMM zugesetzt werden. Mit dem Fluramtest sind nach 60 min. keine freien Aminogruppen mehr detektierbar. Nach dreistündigem Rühren bei Raumtemperatur wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff über eine Glasfilterfritte G-3 abgesaugt und das Polymer mit Ether zur

Kristallisation gebracht. Durch Umfällen aus Methanol/Ether wird das Rohprodukt gereinigt und anschließend über P_4O_{10} im Hochvakuum getrocknet. Die Aminosäureanalyse erbrachte das Verhältnis: Gly: Ala = 1.00:0.98

4.2. Aufbau des Nonapeptids

39 g BOC-Ala-Polymer werden in der hier dargestellten Weise behandelt:

(1) Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit 1.2 N HCl/AcOH. Hierzu wird eine etwa 10 %-ige Lösung des Polymers im Abspaltungsreagens hergestellt, und der Ansatz wird, sobald eine klare Lösung entstanden ist, 20 min. unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Dann wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der ölige Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen. Durch Zugabe von Ether wird das Produkt ausgefällt. Das Polymer läßt sich durch Umfällen aus Methylenchlorid/Ether reinigen und wird anschließend über P_4O_{10} im Hochvakuum getrocknet.

(2) Darstellung der symmetrischen Anhydride. Das geschützte Aminosäurederivat wird in einem geeigneten Lösungsmittel (Methylenchlorid, THF, DMF) gelöst, im Eisbad auf $0^{\circ}C$ gekühlt, und mit der stöchiometrischen Menge an 2 N DCCI-Lösung (CH_2Cl_2) versetzt. Man rührt 1 Std. bei $0^{\circ}C$ und 1 Std. bei Raumtemperatur. Die voraktivierte Aminosäure wird über eine Glasfilterfritte G-3 in die Lösung des Polymers eingesaugt.

(3) Durchführung der Kupplungsreaktion. Nach dem Einsaugen des symmetrischen Anhydrids gibt man 3 ml N-Methylmorpholin hinzu und rührt den Ansatz unter Feuchtigkeits- und Lichtausschluß 3-4 Std. Als Umsatztest wird der Fluramtest benutzt.

Tab. 6: Syntheseverlauf des Nonapeptidpolymers

Ala-POE	Kupplung mit Aminosäurederivat	Überschuß an Anhydrid	Lösgs.-mittel	Kupplungsdauer [h]	Fällungen	BOC-Abspaltungen ml/Lösungsmittel	Reaktionsdauer [min.]
Lys(o-BrZ)	BOC-Lys(o-BrZ)-OH	3	CH_2Cl_2	3	3	300/1.2 N HCl/AcOH	20
Pro	BOC-Pro	3	CH_2Cl_2	3	3	300/1.2 N HCl/AcOH	20
Thr(Bzl)	BOC-Thr(Bzl)-OH	3	CH_2Cl_2	3.5	3	400/1.2 N HCl/AcOH	20
Tyr(o-ClZ)	BOC-Tyr(o-ClZ)-OH	3	CH_2Cl_2	4	3	400/1.2 N HCl/AcOH	20
Phe	BOC-Phe	3	CH_2Cl_2	3	3	400/1.2 N HCl/AcOH	20
Phe	BOC-Phe	3	CH_2Cl_2	3	3	400/1.2 N HCl/AcOH	30
Gly	BOC-Gly	3	CH_2Cl_2	3	3	500/1.2 N HCl/AcOH	30
BOC-Arg(Mbs)	BOC-Arg(Mbs)-OH	3	CH_2Cl_2/DMF 9:1	4	8	500/1.2 N HCl/AcOH	35

(4) Am Reaktionsende wird das Polymerpeptid mit Ether gefällt, in einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und wiederum mit Ether kristallisiert. Dieser Vorgang wird solange wiederholt, bis alle niedermolekularen Verunreinigungen entfernt sind. Das Produkt wird im Hochvakuum über P_4O_{10} getrocknet.

Am Ende der Aufbaureaktionen wurde ein hochbeladenes Polymerpeptid in einer Menge von 37.9 g erhalten. Sein Aussehen war annähernd weiß und grobkörnig. Der Syntheseverlauf wird in Tab. 6 dargestellt. Die nach den einzelnen Kupplungsschritten erhaltenen Aminosäureanalysen sind in Tab. 7 zusammengestellt.

Tab. 7: Aminosäureanalyse der Peptidpolymerstufen

Peptid	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg
Di-	1.0 (1)	0.95 (1)	0.94 (1)					
Tri-	1.0 (1)	0.95 (1)	0.94 (1)	1.11 (1)				
Tetra-	1.0 (1)	0.94 (1)	0.91 (1)	1.02 (1)	0.97 (1)			
Penta-	1.0 (1)	0.96 (1)	0.92 (1)	0.86 (1)	1.01 (1)	1.22 (1)		
Hexa-	1.0 (1)	0.90 (1)	0.90 (1)	0.86 (1)	0.91 (1)	1.04 (1)	0.94 (1)	
Hepta-	1.0 (1)	0.85 (1)	0.89 (1)	1.01 (1)	0.88 (1)	0.99 (1)	1.83 (2)	
Okta-	2.0 (2)	0.93 (1)	0.99 (1)	0.93 (1)	0.95 (1)	1.09 (1)	1.84 (2)	
Nona-	2.0 (2)	1.03 (1)	0.99 (1)	1.04 (1)	1.01 (1)	1.15 (1)	1.92 (2)	1.52 (1)

Glycin ist Referenzaminosäure und daher = 1.00 gesetzt.
In Klammern stehen die theoretischen Werte.

4.3. Abspaltung des geschützten Nonapeptids

4.2 g (0.44 mMol Peptid) Polymer-Peptid werden in abs. Methanol (ca. 200 ml) gelöst. Die Lösung wird in das Bestrahlungsgefäß gegeben, mit Methanol soweit aufgefüllt, daß die Lampe voll bedeckt ist und mit Stickstoff 6 min. sauerstofffrei gemacht. Die Lampe sitzt in einem doppelwandigen Quarzgefäß und wird während der Reaktion mit einer konz. Kupfersulfatlösung gekühlt. Kupfersulfatlösung dient dazu, Wellenlängen unterhalb 320 nm zu absorbieren. Als Kühlaggregat dient ein Kryostat, der mit dieser Lösung beschickt ist. Die Bestrahlungszeit ist 17 Std. und die Reaktionstemperatur 20°C. Die Reaktionslösung hat sich während der Bestrahlung nicht verfärbt.

Aufarbeitung

Man verdünnt mit Methanol auf 500 ml und hält diese Lösung 3 Std. im Tiefkühlschrank bei -30°C. Das ausgefallene POE und noch vorhandene POE-Peptid wird rasch über eine Glasfilterfritte G-3 abgesaugt. Das polymere Material wird nun noch zweimal dieser Behandlung unterzogen und die vereinigten Filtrate, die das Nonapeptid enthalten, werden am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt. Man erhält so 500 mg Rohpeptid. Das Polymer zeigte eine Restbeladung von ca. 15 %, das bedeutet, die Photolyse erbrachte eine Abspaltung von 85 %.

4.4. Reinigung des geschützten Peptids

Das Rohpeptid wird in 20 ml Methanol/2 ml DMF gelöst und an Sephadex LH 20 mit dem Elutionsmittel Methanol gereinigt (Säulendimension: 2.5 x 120 cm). Die Detektion erfolgt mittels eines Durchflußphotometers bei 254 nm. Abb. 11 zeigt das bei der ersten Chromatographie erhaltene Elutionsdiagramm.

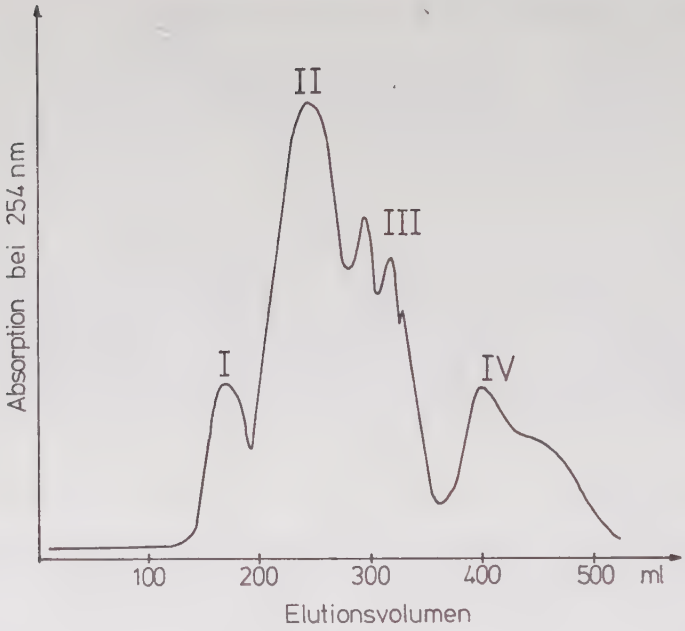


Abb. 11: Elutionsdiagramm des geschützten Nonapeptids an Sephadex-LH 20

Die so erhaltenen Peaks lassen sich folgendermaßen zuordnen:

I = Polymere Rückstände (POE), Dragendorff positiv
II = geschütztes Nonapeptid
III = Rumpfsequenzen
IV = DMF

Man erhält 450 mg weißes Peptid (Fraktion II), das folgende Aminosäurezusammensetzung aufweist:

	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Lys	Pro	Ala
gef.:	1.03	0.92	1.92	0.95	1.05	0.99	0.99	1.00
Theorie:	1	1	2	1	1	1	1	1

Die vereinigten Rumpfpeptide bzw. Fehlsequenzen (Fraktion III) zeigen bei der Aminosäureanalyse die Zusammensetzung:

	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	0.59	0.25	0.40	0.70	0.89	1.01	0.83	1.00
Theorie:	1	1	2	1	1	1	1	1

Aus der ASA erkennt man die Anreicherung des C-terminalen Pentapeptids B_{26-30} Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala (Ausbeute 50 mg).

Die Fraktion II wird rechromatographiert, vom Lösungsmittel befreit und lyophilisiert. Man erhält 394 mg Nonapeptid, das als reinweißes, voluminöses Pulver vorliegt.
Ausbeute: 394 mg (49 % bezogen auf BOC-Ala-Polymer)
Reinheitskontrolle: DC R_F = 0.82 (A)
= 0.60 (F)
Ninhydrin +
CT +
Schmelzpunkt: 179°C (Zersetzung)
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -17.8° (c = 1, DMF)
Elementaranalyse: $C_{88}H_{105}N_{13}O_{21}BrClS$ (1828)

	C	H	N
ber.:	57.82 %	5.79 %	9.96 %
gef.:	55.91 %	5.51 %	9.75 %

4.5. Schutzgruppenabspaltung mit HF (110,119)

80 mg (0.044 mMol) gründlich getrocknetes, geschütztes Nonapeptid werden mit 10 ml flüssigem Fluorwasserstoff bei 0°C 1 Std. lang gerührt. Als Scavenger wird 1 ml Anisol zuge-

setzt. Mit einem Stickstoffstrom wird dann das HF vertrieben, und der ölige Rückstand im Vakuum über KOH getrocknet. Das Rohprodukt wird in 30 ml Wasser aufgenommen und zur Entfernung des Anisols und der abgespaltenen Schutzgruppen dreimal mit Ether extrahiert. Man lyophilisiert die klare wässrige Lösung und erhält 55 mg reinweißes, lockeres Peptid.

4.6. Reinigung des Nonapeptids

Das rohe Peptid wird durch Ionenaustauschchromatographie mit CM-Sephadex G-25 (Säulendimension 1.2 x 50 cm) und einem Elutionsgradienten gereinigt. Der Anfangspuffer besteht aus 500 ml 0.01 M Ammoniumacetatlösung, pH 4.5. Nach Durchlauf von 100 ml, wird der Ammoniumacetatgradient angelegt, indem in das Mischgefäß 0.1 M Ammoniumacetatlösung des pH 6.7 eingetropft wird. Später wird dann die Salzkonzentration erhöht. In Abb. 12 ist das Elutionsdiagramm und die Gradientenzusammensetzung dargestellt.

Peak III wird isoliert und zur Entfernung des Salzes dreimal lyophilisiert. Man erhält 31 mg weißes, voluminöses Peptid. Dieses entspricht einer Ausbeute von 53 %. Wird die Ausbeute auf BOC-Ala-Polymer bezogen, sind dies 26 %.

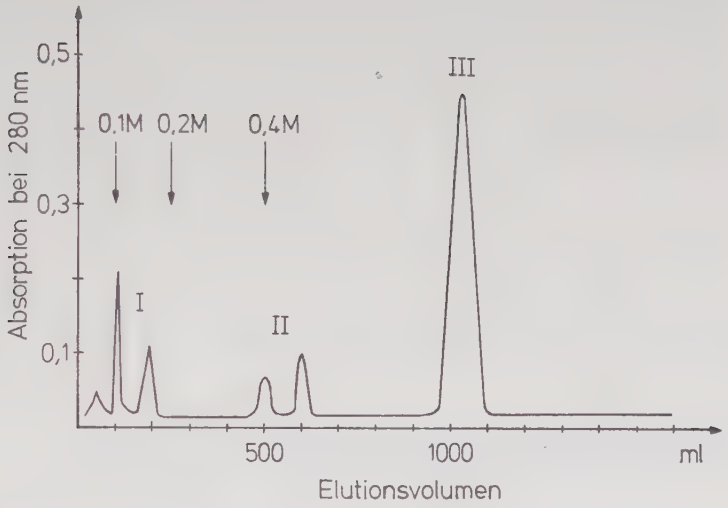


Abb. 12: Elutionsdiagramm des freien Nonapeptids an CM-Sephadex

4.7. Reinheitskontrollen und physikalische Eigenschaften

Dünnschichtelektrophorese

Zur Elektrophorese kommen Celluloseplatten und zwei Puffersysteme zum Einsatz. Die Laufdauer ist 1 Std. bei 400 V.

Puffer A: Pyridin/Essigsäure pH 3.7
Die molaren Konzentrationen an Pyridin bzw. Essigsäure sind 0.04 bzw. 0.58.
R_F = 0.62 relativ zu Lysin

Ninhydrin +
Pauly +
Sakaguchi +
CT +

Puffer B: Collidin/ Essigsäure pH 6.9
Die molaren Konzentrationen an Collidin bzw. Essigsäure sind 0.067 bzw. 0.054.
R_F = 0.66 relativ zu Lysin

In beiden Systemen zeigte sich nur ein einziger, scharf umrissener Fleck.

DC

Auf Celluloseplatten ergibt sich ein Fleck,
R_F = 0.55 (A)

Auf Kieselgel ist ebenfalls nur ein Fleck sichtbar,
R_F = 0.07 (A)

Aminosäureanalyse

	Arg	Gly	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.00	1.00	2.04	1.01	0.98	0.99	0.99	1.00
Theorie:	1	1	2	1	1	1	1	1

Razemisierungstest

D-Anteile in %

	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	0.93	0.85	1.05	0.50	0.50	1.22	1.56
erwarteter Wert nach (120)	1.0	1.40	1.20	0.1	2.5	1.4	1.3

Säulenchromatographische Untersuchung

Bei der Chromatographie des Nonapeptids über eine Sephadex G-10 Säule wird ein einziger hochsymmetrischer Peak erhalten. Eine anschließende Ionenaustauschchromatographie, jetzt aber mit CM-Cellulose, durchgeführt mit Ammoniumacetatpuffer steigender Konzentration, beweist durch das

Erscheinungsbild eines einzelnen, symmetrischen Peaks die hohe Reinheit des synthetischen Peptids. Bei beiden Untersuchungen wurden die Peaks mit 254 und 280 nm vermessen.

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -49.3^{\circ}$ (c = 1, 3 % AcOH)

Elementaranalyse

$C_{53}H_{75}N_{13}O_{12} \times 3\ CH_3COOH \times 3\ H_2O$ (1320)

	C	H	N
ber.:	53.68 %	6.95 %	13.79 %
gef.:	52.83 %	6.17 %	13.79 %

5. Synthese des Rinderinsulinfragments B_{20-30}

5.1. Aufbau des Undekapeptids am löslichen Träger

Zum Aufbau des Undekapeptids wird das Nonapeptid-Polymer aus 4.2. um die Aminosäuren Glu(Bzl) (B_{21}) und BOC-Gly (B_{20}) verlängert. Der Syntheseverlauf und die bei den Kupplungsschritten erhaltenen Aminosäureanalysen werden gemeinsam mit dem Dokosapeptid (Tab. 8 und 9) abgehandelt.

Nach den Kupplungsreaktionen hat man das polymergebundene Undekapeptid in einer Ausbeute von 33.8 g als elfenbeinfarbene Kristalle vorliegen. Zur Untersuchung des Syntheseverlaufs werden 13.5 g zurückbehalten.

5.2. Abspaltung des geschützten Undekapeptids

2.0 g (0.19 mMol Peptid) POE-Peptid werden in trockenem DMSO gelöst und analog 4.3. bestrahlt. Die Bestrahlungszeit ist 21 Std. und die Reaktionstemperatur 26°C. Die

Reaktionslösung hat sich bei der Bestrahlung etwas gelb verfärbt und ist auch leicht übelriechend geworden.

Aufarbeitung

Das DMSO wird in einer Destillationsapparatur bei 35°C Badtemperatur im Vakuum bei 0.2 Torr entfernt. Die zurückbleibende gelblich-braune Masse wird wie üblich mit Methanol extrahiert (siehe 4.3.). Man erhält so 230 mg geschütztes Rohpeptid. Das zurückgewonnene polymere Material wird einer Restbeladungsanalyse unterworfen, die einen Abspaltungsgrad von 78-80 % erbringt.

Bemerkung

Ein Abspaltungsversuch mit Methanol als Lösungsmittel ergab die gleiche Ausbeute wie die oben beschriebene Abspaltung in DMSO.

5.3. Reinigung des geschützten Undekapeptids

Das Rohpeptid wird in 18 ml Methanol/4 ml DMF gelöst und durch Säulenchromatographie gereinigt. Als Säulenmaterial kommt Sephadex LH 20 (Säulendimension 2.5 x 120 cm) und als Elutionsmittel Methanol zum Einsatz. Die Detektion erfolgt mittels eines Durchflußphotometers bei 254 nm. Der Peptidpeak erscheint nach hinten abfallend schlecht aufgelöst und unsymmetrisch.

Die erhaltene Peptidfraktion wird nochmals chromatographiert, vom Lösungsmittel befreit und lyophilisiert. Man erhält 193 mg (48 %) reinweißes, voluminöses Peptid.

Aminosäureanalyse

	Gly	Glu	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.43	0.66	1.09	1.70	0.97	1.00	1.04	1.05	0.94
Theorie:	2	1	1	2	1	1	1	1	1

5.4. Schutzgruppenabspaltung mit HF

152 mg (0.072 mMol) werden analog 4.5. mit flüssigem Fluorwasserstoff behandelt. Nach dem Lyophilisieren erhält man 95 mg reinweißes, lockeres Produkt.

5.5. Reinigung des Undekapeptids

Das rohe Peptid wird durch Ionenaustauschchromatographie mit einer CM-Cellulose-Säule (Säulendimension 1.9 x 23 cm) gereinigt. Als Elutionsmittel dient ein Ammoniumacetapuffer, dessen Zusammensetzung mit dem Elutionsdiagramm in Abb. 13 dargestellt ist.

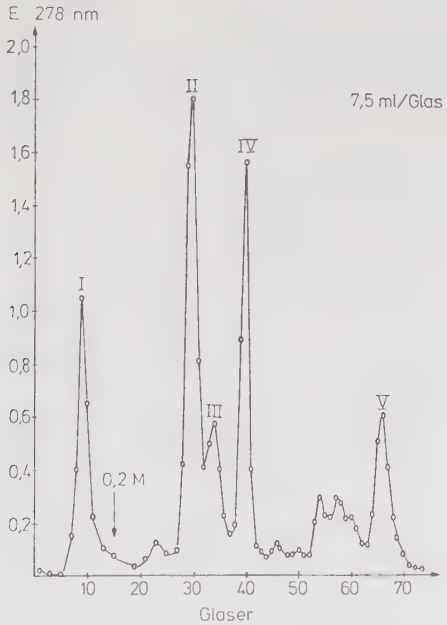


Abb. 13: Elutionsdiagramm des ungeschützten Undekapeptids an CM-Cellulose

Es wurden 5 Fraktionen gesammelt:

Fraktion	Gläser	Ausbeute
I	7-11	4 mg
II	28-31	3 mg
III	33-36	7 mg
IV	38-41	33 mg
V	64-68	8 mg

Die angegebenen Ausbeuten ergeben sich nach 3 maligem Lyophilisieren der einzelnen Fraktionen.

Aminosäureanalysen

Vor der Säulenchromatographie, roh:

	Gly	Glu	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.36	0.55	1.01	1.68	0.98	0.90	0.98	1.00	0.97
Theorie:	2	1	1	2	1	1	1	1	1

Nach der Säulenchromatographie:

	I	II	III	IV	V	Theorie
Gly	0.81	0.85	0.40	1.91	1.90	2
Glu	0	0.05	0	1.10	0.28	1
Arg	0	0.53	0.31	1.03	1.28	1
Phe	1.47	1.34	0.74	2.00	2.05	2
Tyr	0.85	0.72	0.98	1.03	1.03	1
Thr	0.88	0.77	0.88	0.92	0.93	1
Lys	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1
Pro	0.92	1.00	0.91	1.02	1.00	1
Ala	1.03	0.84	1.04	1.00	1.00	1

Die Fraktion IV stellt somit die Undekapeptidfraktion dar. 33 mg entspricht einer Ausbeute von 30 % bezogen auf das

eingesetzte, geschützte Undekapeptid. Wird die Ausbeute auf BOC-Ala-Polymer bezogen, ergeben sich 15 %.

5.6. Optimierung der Reinheit vom geschützten Undekapeptid

108 mg des über LH 20 gereinigten Undekapeptids werden mit Hilfe einer Kieselgelsäule (Säulendimension 2.8 x 95 cm) gereinigt. Es wird Kieselgel der Korngröße 40-63 µm und als Elutionsmittel Chloroform/Methanol/Essigester/Essigsäure (65:25:9:1; Volumen) verwendet. Am Durchflußphotometer wird bei 254 und 276 nm detektiert. Man erhält das in Abb. 14 dargestellte Elutionsdiagramm.

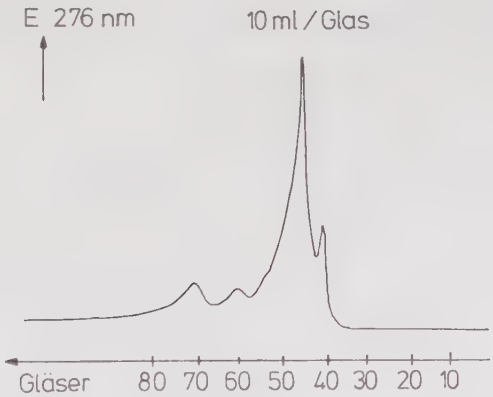


Abb. 14: Elutionsdiagramm des geschützten Undekapeptids an Kieselgel

Es werden 2 Fraktionen gesammelt:

I	Glas 46-50	Ausbeute 50 mg
II	Glas 68-78	Ausbeute 20 mg

Die beiden isolierten Fraktionen werden durch Aminosäureanalyse charakterisiert:

	Gly	Glu	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef. I:	1.65	0.88	1.04	1.88	1.10	1.00	1.00	1.09	1.01
II:	1.27	0.24	1.67	2.05	1.06	1.00	2.55	1.16	3.73
Theorie:	2	1	1	2	1	1	1	1	1

Das Produkt I wird an Sephadex LH 20 (MeOH) noch einmal chromatographiert und ist nun dünnschichtchromatographisch rein. Man erhält 45 mg Peptid.

DC: R_F = 0.82 (A)
= 0.39 (B)

Ninhydrin +

CT +

Schmelzpunkt: 181-182°C (Zersetzung)

Drehwert: $[\alpha]_D^{21}$ = -21.4° (c = 1; DMF)

Elementaranalyse: $C_{102}H_{121}O_{25}N_{15}BrClS$ (2104.6)

	C	H	N	S
ber.:	58.21 %	5.79 %	9.98 %	1.52 %
gef.:	57.21 %	5.49 %	9.73 %	1.87 %

5.7. Schutzgruppenabspaltung mit HF

45 mg (0.021 mMol) Undekapeptid werden 30 min., anstatt 60 min., mit HF unter den üblichen Bedingungen behandelt. Nach der Aufarbeitung erhält man 30 mg ungeschütztes Peptid. Zur weiteren Reinigung wird dieses Produkt an CM-Cellulose (siehe 5.5.) chromatographiert. Im Vergleich zu Abb. 13 wird die hohe Reinheit des Ausgangsproduktes in Abb. 15 dokumentiert.

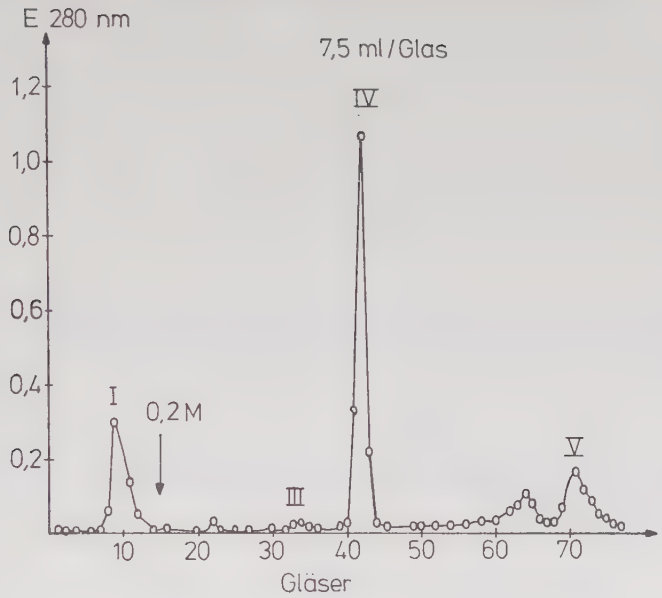


Abb. 15: Reinigung des ungeschützten Undekapeptids an CM-Cellulose

Durch Rechromatographieren von IV ist im Elutionsdiagramm nur noch ein einziger Fleck zu sehen. Nach dreimaligem Lyophilisieren erhält man 14 mg (43 %) reines Undekapeptid. Bezogen auf BOC-Ala-Polymer sind dies 21 %.

Aminosäureanalyse:

	Gly	Glu	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	1.93	1.01	1.00	2.04	1.00	0.93	1.01	1.00	0.96
Theorie:	2	1	1	2	1	1	1	1	1

5.8. Reinheitskontrollen und physikalische Eigenschaften

Dünnschichtelektrophorese

Durchführung und Puffer siehe 4.7.

Puffer A: Pyridin/Essigsäure pH 3.7
R_F = 0.61 relativ zu Lysin

Puffer B: Collidin/Essigsäure pH 6.9
R_F = 0.58 relativ zu Lysin

In beiden Puffersystemen erhält man mit den üblichen Anfärbereagentien nur einen einzigen, scharf umrissenen Fleck.

DC

Auf Kieselgelfertigplatten zeigt sich ein Fleck,
R_F = 0.09 (A)
Ninhydrin +
CT +

Razemisierungstest

D-Anteile in %

	Glu	Arg	Phe	Tyr	Thr	Pro	Lys	Ala
gef.:	0.9	1.1	1.0	0.8	0.5	2.6	1.9	1.7
erwarteter Wert nach (120):	2.0	1.0	1.4	1.2	0.1	2.5	1.4	1.3

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = -56.1° (c = 1, 3 % AcOH)

Elementaranalyse:

$C_{60}H_{85}N_{15}O_{16} \times 3\ CH_3COOH \times 5\ H_2O$ (1542.7)

	C	H	N
ber.:	51.39 %	6.99 %	13.62 %
gef.:	49.62 %	6.23 %	14.03 %

6. Synthese des Rinderinsulinfragments B_{9-30}

6.1. Aufbau des vollgeschützten Dokosapeptids

Zum Aufbau des 22iger Peptids wird das Material, das bei der Undekapeptidsynthese zurückgehalten wurde, weiterverwendet. Der Syntheseverlauf und die dazugehörenden Aminosäureanalysen sind in Tab. 8 und Tab. 9 dargestellt.

Nach der Kupplung von Arginin wurden mit Acetanhydrid/NMM nicht abreagierte Aminofunktionen des Glycins blockiert. Ab dieser Stufe wurde dann grundsätzlich jede Kupplung zweimal mit dem selben Ansatz durchgeführt. Die Acetanhydridreaktion wurde ab der Dodekapeptidstufe ebenfalls routinemäßig durchgeführt. Die Synthese wurde mit 20.3 g Polymer-Peptid begonnen und auf der Dokosapeptidstufe mit 18 g beendet.

Tab. 8: Syntheseverlauf des Dokosapeptidpolymers

Nonapeptid-polymer	Kupplung mit Derivat	Überschuß an Anhydrid	Lösungsmittel	
Glu(Bzl)	BOC-Glu(Bzl)-OH	4	CH_2Cl_2/DMF	4:1
Gly	BOC-Gly	4	CH_2Cl_2/DMF	3:1
Cys(SiP)	BOC-Cys(SiP)-OH	4	CH_2Cl_2/DMF	2:1
Val	BOC-Val	4	CH_2Cl_2/DMF	1:1
Leu	BOC-Leu	4	DMF	
Tyr(o-ClZ)	BOC-Tyr(o-ClZ)-OH	4	DMF/CH_2Cl_2	4:1
Leu	BOC-Leu	4	DMF/CH_2Cl_2	4:1
Ala	BOC-Ala	4	DMF/CH_2Cl_2	4:1
Glu(Bzl)	BOC-Glu(Bzl)-OH	4	DMF/CH_2Cl_2	4:1
Val	BOC-Val	4	DMF/DMSO	3:1
Frag.	Frag.-OH	4/HOBT	DMF/DMSO	2:1

Fortsetzung der Tabelle 8

Nonapeptid-polymer	Kupplungs-dauer	Fällungen	BOC-Abspaltungen ml/Lösungsmittel	Reaktions-dauer
Glu(Bzl)	2.5 h	2	200 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Gly	3.5 h	3	200 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Cys(SiP)	4 h	3	135 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Val	4 h	3	160 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Leu	4 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Tyr(o-ClZ)	2 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Leu	3 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Ala	3.5 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Glu(Bzl)	4 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Val	4 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Frag.	4 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.

Frag. = BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu

6.2. Fragmentkupplung am löslichen Träger

Der Aufbau bis zur Nonadekapeptidstufe wird, wie aus Tab. 9 ersichtlich, nach den gewöhnlichen, stufenweisen Aufbauprinzipien durchgeführt. In einem Pilotversuch wird nun 1 g POE-Peptid stufenweise, also unter Standardbedingungen mit BOC-Leu, dann mit BOC-His(BOC)-OH und zuletzt mit BOC-Ser(Bzl)-OH zum 22iger Peptid aufgebaut. Vergleichend hierzu wird 1 g POE-Peptid durch Einsatz von BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH zum 22iger Peptid umgesetzt. Die größere Übereinstimmung der Aminosäureanalyse und der Fluramtest, der einen rascheren und quantitativen Umsatz anzeigte, rechtfertigen den eingeschlagenen Syntheseweg.

Tab. 9: Aminosäurezusammensetzung der Polymerpeptidstufen

Peptid	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg	Glu	Cys^{+}	Val^{+++}	Leu	His	Ser
10-er	2.00 (2)	1.00 (1)	0.96 (1)	0.96 (1)	0.97 (1)	1.00 (1)	1.79 (2)	1.40 (1)	0.73 (1)					
11-er	2.55 (3)	1.00 (1)	0.97 (1)	0.98 (1)	1.00 (1)	0.98 (1)	1.71 (2)	1.37 (1)	0.56 (1)					
12-er	nicht analysiert													
13-er	2.74 (3)	1.10 (1)	1.02 (1)	1.05 (1)	1.05 (1)	1.00 (1)	1.88 (2)	1.43 (1)	0.72 (1)	-- (1)	0.56 (1)			
14-er	2.81 (3)	1.00 (1)	1.01 (1)	0.93 (1)	1.05 (1)	0.78 (1)	1.93 (2)	1.39 (1)	0.60 (1)	-- (1)	0.68 (1)	0.70 (1)		
15-er	2.71 (3)	1.17 (1)	1.00 (1)	1.17 (1)	0.97 (1)	1.71 (2)	2.02 (2)	1.46 (1)	0.69 (1)	-- (1)	0.65 (1)	0.68 (1)		
16-er	2.68 (3)	1.00 (1)	1.08 (1)	0.92 (1)	0.94 (1)	1.30 (2)	1.61 (2)	1.33 (1)	0.65 (1)	-- (1)	0.31 (1)	1.21 (2)		
17-er	3.28 (3)	1.88 (2)	1.06 (1)	1.02 (1)	0.87 (1)	1.65 (2)	2.27 (2)	1.63 (1)	0.71 (1)	-- (1)	0.62 (1)	1.47 (2)		
18-er	2.91 (3)	1.76 (2)	1.05 (1)	1.08 (1)	1.00 (1)	0.40^{++} (2)	1.68 (2)	1.44 (1)	1.68 (2)	-- (1)	0.46 (1)	1.47 (2)		

Fortsetzung der Tabelle 9

Peptid	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg	Glu	Cys[+]	Val[+++]	Leu	His	Ser
19-er					nicht analysiert									
++++														
20-er					nicht analysiert									
++++														
21-er					nicht analysiert									
++++														
22-er	3.00 (3)	1.94 (2)	1.04 (1)	1.05 (1)	0.95 (1)	2.12 (2)	2.23 (2)	1.64 (1)	1.67 (2)	-- (1)	1.14 (2)	1.89 (3)	0.56 (1)	0.96 (1)
Frag.-kuppl.	3.00	1.82	1.03	1.01	0.95	1.98	2.19	1.50	1.52	--	1.15	1.88	0.60	0.50

[+] nicht bestimmt

[++] teilweise Zerstörung, da kein Phenolzusatz

[+++] Hydrolyseresistenz Val-Cys(SiP)

[++++] stufenweiser Aufbau, eine ASA wurde erst nach der Serin-Kupplung durchgeführt

Tripeptidsynthese, klassisch

BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-OMe (106)

19.5 g (66 mMol) BOC-Ser(Bzl)-OH und 30 g (73 mMol) H-His(Trt)-OMe (aus 35 g H-His(Trt)-OMe x HCl durch $NaHCO_3$/$CHCl_3$-Extraktion zuvor hergestellt) werden bei Raumtemperatur in 170 ml Methylenchlorid gelöst. Man kühlt mit einer Eis/Methanol-Kältemischung auf -15°C und gibt 33 ml 2 M DCCI-Lösung hinzu. Nach 30 min. wird 1 ml NMM zugesetzt. Nach Ablauf von 2 Std. wird das Kühlmedium entfernt und 4 Std. bei 0°C gerührt. Nun setzt man nochmals 1 ml NMM hinzu und läßt die Reaktion über Nacht bei Raumtemperatur weiterlaufen. Zur Entfernung des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs wird über eine Glasfilterfritte G-3 abgesaugt und das Lösungsmittel entfernt. Das verbleibende Öl wird in Acetonitril aufgenommen und vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das Acetonitril wird am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wird in 200 ml Essigester gelöst, 5 mal mit Zitronensäurelösung und 5 mal mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Anschließend wird mit Kochsalzlösung bis zur Neutralität des Waschwassers extrahiert und die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel vollständig entfernt und das gelbe Öl in wenig Methylenchlorid/Diisopropylether gelöst. Die Lösung wird über Nacht in den Tiefkühlschrank gestellt, wobei sich weiße Kristalle und ein braunes Öl absetzen. Die überstehende, wasserklare Lösung wird einrotiert. Sie enthält das reine Dipeptid. Im Niederschlag können hingegen 6 Produkte durch DC nachgewiesen werden.

Ausbeute: 43.6 g (96 %) (Lit.: 95 %)

Reinheitskontrolle: DC R_F = 0.84 (A)
= 0.79 (B)

Ninhydrin	+
UV	+
CT	+
Pauly	-

Razemisierungstest:

	D-Ser	D-His
gef.:	0.6 %	4.1 %
erwarteter Wert nach Lit. (120):	2.2 %	3.4 %

BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-OH

43.5 g (63.5 mMol) Dipeptidmethylester werden in Dioxan/Wasser (3:1, Volumenteile) am pH-Stat bei pH 10-11 verseift. Als Base werden 2.8 g NaOH in 100 ml Wasser gelöst und während 4 Std. zugesetzt. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Bei Reaktionsende wird mit Zitronensäure auf pH 7.5 angesäuert und das Dioxan am Rotationsverdampfer bei 30°C entfernt. Mit Zitronensäurelösung wird der Rückstand auf pH 3 gebracht und mit 300 ml Essigester extrahiert. Die organische Phase wird mehrfach mit Kochsalzlösung extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Der Essigester wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der weiße Schaum in 70 ml Methylenchlorid und 400 ml Diisopropylether gelöst. Man versetzt mit Petrolether und läßt das Produkt im Tiefkühlschrank auskristallisieren. Das kristalline Material wird abgesaugt und mit Petrolether gewaschen. Durch Wiederholung dieser Reinigungsoperation erhält man die dünnschichtchromatographisch reine Peptidylsäure.

Ausbeute: 38.8 g (91 %)

Reinheitskontrolle: DC R_F = 0.72 (A)
= 0.39 (B)

Ninhydrin	+
UV	+
CT	+
Pauly	-

Razemisierungstest:

	D-Ser	D-His
gef.:	0.1 %	3.6 %
erwarteter Wert nach Lit. (120):	2.2 %	3.4 %

Schmelzpunkt: ab 115°C allmähliche Zersetzung

BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OMe

38.8 g (57.6 mMol) Dipeptid und 7.8 g (57.6 mMol) HOBT werden in Tetrahydrofuran gelöst und im Eisbad gekühlt. Man gibt 28.8 ml 2 M DCCI-Lösung dazu und rührt 1 Std. in der Kälte. Die voraktivierte Komponente wird zu einer Suspension von 11.8 g (65 mMol) H-Leu-OMe x HCl in Methylenchlorid filtriert. Man gibt 10.2 ml (90 mMol) NMM dazu und läßt in der Kälte bei 0°C rühren. Die Reaktion läßt sich dünnschichtchromatographisch verfolgen. Nach einer Reaktionsdauer von insgesamt 4 Std. wird die Reaktionslösung über eine G-3 Fritte abfiltriert und das Lösungsmittel abrotiert. Der Rückstand wird in Essigester aufgenommen, mit Zitronensäurelösung, dann mit Natriumhydrogencarbonatlösung und zuletzt mit Kochsalzlösung extrahiert. Man trocknet die organische Phase über Natriumsulfat und erhält nach Entfernung des Lösungsmittels das dünnschichtchromatographisch reine Tripeptid als Öl.

Ausbeute: 44 g (95.4 %)

Reinheitskontrolle: DC R_F = 0.74 (A)
= 0.82 (B)

Ninhydrin	+
UV	+
CT	+
Pauly	-

Razemisierungstest:

	D-Ser	D-His[+]	D-Leu
gef.:	1.0 %	7.6 %	1.0 %
erwarteter Wert nach Lit. (120):	2.2 %	3.4 %	1.5 %

[+]Wert sehr unsicher, da der D-His-Peak eine deutliche Schulter aufwies.

Aminosäureanalyse:

	Ser	His	Leu
gef.:	0.88	1.00	0.93

Drehwert: $[\alpha]_D^{25}$ = -6.9^o (c = 1, MeOH)

BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH

6.2 g (7.7 mMol) Tripeptidmethylester werden in Dioxan/Wasser 3:1 (Volumenteile) gelöst und mit der berechneten Menge (0.31 g) NaOH, die als 0.5 N Lösung eingesetzt wird, zur Reaktion gebracht. Die Reaktion wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Anschließend wird mit Zitronensäure auf pH 6.5 gebracht und das Dioxan am Rotationsverdampfer abgezogen. Der Rückstand wird mit Zitronensäure auf pH 3 angesäuert und mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wird mit Kochsalzlösung extrahiert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhält man das Tripeptid als weißen Schaum. Dieser kann mit Methylenchlorid gelöst werden und mit Diisopropylether kann das Tripeptid in der Kälte gefällt werden. Als weitere Möglichkeit kann das Dicyclohexylammoniumsalz gebildet werden, das aus Aceton/Petrolether gefällt wird. Beide Produkte weisen keinen definierten Schmelzpunkt vor.
Ausbeute: 5 g (82.5 %)
Reinheitskontrolle: DC R_F = 0.84 (A)
= 0.65 (D)

Ninhydrin	+
UV	+
CT	+
Pauly	-

Razemisierungstest:

	D-Ser	D-His[+]	D-Leu
gef.:	3.8 %	7.9 %	2.2 %
erwarteter Wert nach Lit. (120):	2.2 %	3.4 %	1.5 %

[+] Wert sehr unzuverlässig, da der D-His-Peak eine deutliche Schulter aufwies

Drehwert:

Tripeptid-OH $[\alpha]_D^{25} = + 0.23^{\circ}$ (c = 1, MeOH)

Tripeptid x DCHA $[\alpha]_D^{25} = - 5.42^{\circ}$ (c = 1, MeOH)

Aminosäureanalyse:

	Ser	His	Leu
Tripeptid-OH	0.89	1.00	0.93
Tripeptid x DCHA	0.94	1.00	0.96

Elementaranalyse:

$C_{46}H_{53}N_5O_7$ (787,96), freie Säure

	C	H	N
ber.:	70.12 %	6.78 %	8.88 %
gef.:	69.81 %	6.91 %	8.77 %

Kupplungsreaktion mit dem polymergebundenen Nonadekapeptid

Zur Voraktivierung werden 3.2 g (4 mMol) Tripeptid mit 0.54 g (4 mMol) HOBT in THF gelöst und im Eisbad vorgekühlt. Man setzt 2 ml 2 N DCCI-Lösung hinzu. Nach insgesamt 2 Std., wobei 1 Std. bei Raumtemperatur gerührt wird, wird die Kupplungskomponente über eine Glasfilterfritte G-3 zum Peptidpolymer, das in DMF/DMSO 2:1 gelöst ist,

einfiltriert. Als Base wird NMM zugegeben. Der Fluramtest zeigte nach 15 min. praktisch keine freien Aminogruppen mehr an. Nach 4 Std. wird die Reaktion abgebrochen. Man fällt dreimal um und kuppelt mit dem gleichen Ansatz 4 Std. lang nach. Man fällt mit Ether aus und reinigt das Peptid nach dem Acetylierungsschritt durch dreimaliges Umfällen aus DMF/DMSO/Ether. Freies Tripeptid ist jetzt nicht mehr detektierbar.

6.3. Abspaltung des geschützten Dokosapeptids

2.0 g (0.17 mMol) Polymerpeptid werden in trockenem DMSO analog 5.2. bestrahlt und aufgearbeitet. Die Bestrahlungszeit ist 21 Std. Nach Entfernung des Lösungsmittels wird ein Methanoltrennungsgang (siehe 4.3. und 5.2.) durchgeführt. Allerdings werden hier 5 % DMF bzw. DMSO pro Fällungsschritt beigemischt. Die vereinigten Filtrate bringen nach zwei Fällungs- und Lyophilisierschritten 190 mg Rohpeptid. Dünnschichtchromatographisch läßt sich in der POE-Fraktion aber immer noch freies Peptid nachweisen. Durch 4 weitere Fällungsschritte werden nochmals 136 mg Rohpeptid gesammelt. Da nach diesen 6 Trennschritten immer noch Peptid im Polymer nachweisbar ist, soll dieses mit Hilfe der Säulenchromatographie vollständig abgetrennt werden. Man benutzt eine kurze, dicke Säule der Dimension 5.5 x 17 cm, die mit grobem Kieselgel (0.063-0.2 mm) gepackt ist. Das Elutionsmittel ist Chloroform/Methanol/Essigester/Essigsäure (65:25:9:1). Auf diese Art trennt man nochmals 150 mg Peptid vom polymeren Träger ab. Rohausbeute: 466 mg (68.5 %)

Aminosäureanalyse der Rohsubstanz:

	Ser	His	Leu	Val	Glu	Ala	Tyr	Cys	Gly
gef.:	0.27	0.26	0.83	0.54	0.62	1.27	1.34	-	1.25
Theorie:	1	1	3	2	2	1	2	1	2

	Arg	Phe	Thr	Pro	Lys
gef.:	0.98	1.66	1.00	1.04	1.11
Theorie:	1	2	1	1	1

6.4. Reinigung des geschützten Dokosapeptids

180 mg (aus der 1. und 2. Fällung mit Methanol) Rohpeptid werden an einer Kieselgelsäule (Säulendimension 2.8 x 95 cm), die mit feinem Kieselgel (40-63 µm) belegt ist, gereinigt.
Das Lösemittel für das Peptid und das Elutionsmittel ist Chloroform/Methanol/Essigester/Essigsäure (65:25:9:1).
In Abb. 16 ist das Elutionsdiagramm dargestellt.

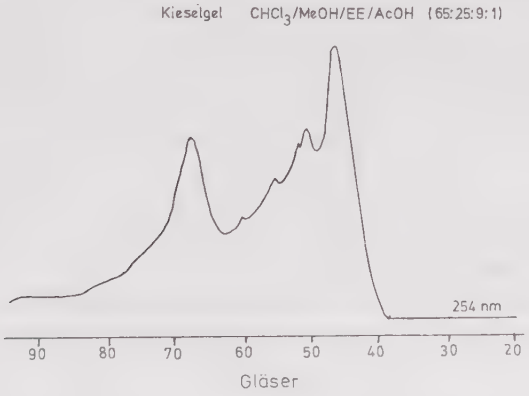


Abb. 16: Reinigung des geschützten Dokosapeptids an Kieselgel

Die Fraktion 1 (Glas 39-44) stellt die gewünschte Peptidfraktion dar. Man erhält nach dem Lyophilisieren 11 mg reinweißes Peptid.
Alle Fraktionen sind POE-frei.

ASA der Fraktion 1:

	Ser	His	Leu^{+}	Val^{+}	Glu	Ala	Tyr	Cys	Gly
gef.:	0.85	0.74	2.1	1.1	1.58	1.35	1.96	-	1.63
Theorie:	1	1	3	2	2	2	2	1	2

	Arg	Phe	Thr	Pro	Lys
gef.:	0.89	1.65	1.00	1.00	1.13
Theorie:	1	2	1	1	1

$^{+}$ Hydrolyseresistenz Leu-Val und Val-Cys(SiP) bei kurzer Hydrolysedauer

Die Fraktionen, die laut Aminosäureanalyse Rumpfsequenzen sind, werden gesammelt.

Auf diese Weise werden die gesamten 466 mg portionsweise an der Kieselgelsäule gereinigt. Man erhält so 135 mg (20 %) geschütztes Dokosapeptid. Die Menge an isolierten Rumpfpeptiden beläuft sich auf 215 mg. In der Rumpfpeptidfraktion ist laut DC aber auch noch etwas sauberes Dokosapeptid enthalten (wird später über Sephadex LH 20 getrennt).

Zur weiteren Reinigung werden die 135 mg aus der Dokosapeptidfraktion mit Hilfe einer LC-Maschine (142) chromatographiert. Als Kieselgelmaterial wird KG 60 15 µm und als Elutionsmittel Chloroform/Methanol/Essigester/Essigsäure (65:25:9:1) eingesetzt. Die Detektionswellenlänge ist 254 nm, das Elutionsdiagramm ist in Abb. 17 dargestellt.

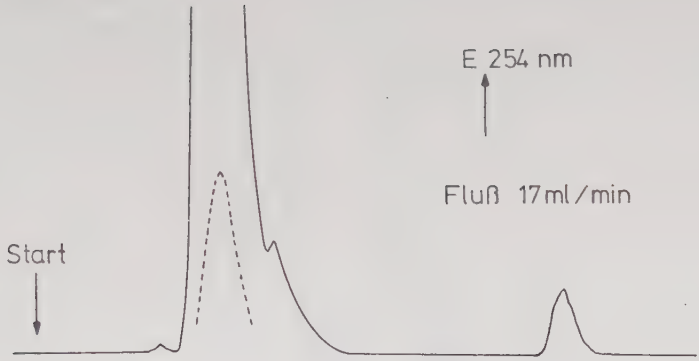


Abb. 17: Elutionsdiagramm des Dokosapeptids an einer LC-Maschine mit Kieselgelsäule

Der Hauptpeak liefert 73 mg DC-reines 22-iger Peptid.

Die bisherigen Selektion nach Polarität der einzelnen Substanzen wird nun durch die Molmassenselektion ergänzt!

Sephadex LH 20

Das gesamte isolierte Material wird über eine Sephadex LH 20-Säule (Säulendimension 2.5 x 95 cm) mit dem Elutionsmittel Chloroform/Methanol 2:1 getrennt.

Hierzu wurden 53 mg des nach der LC-Reinigung sauberen Materials in 18 ml Methanol/2 ml DMF gelöst und an der Säule getrennt. In Abb. 18 ist das Elutionsdiagramm dargestellt.

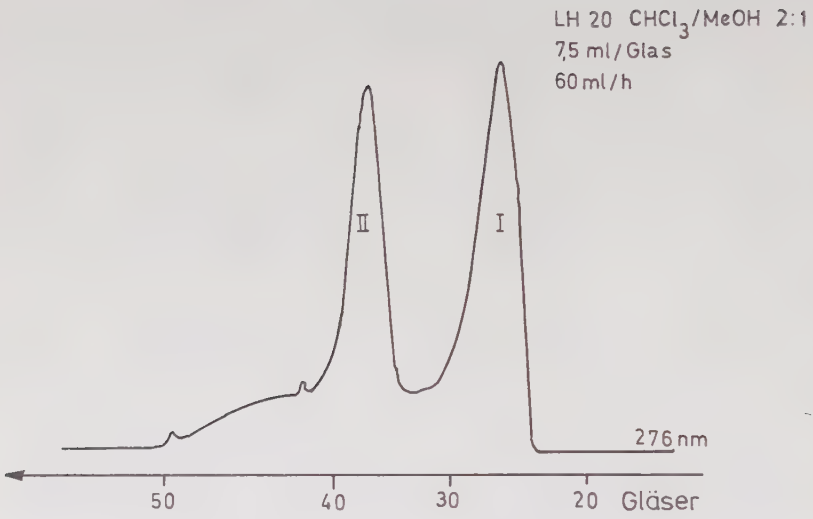


Abb. 18: Reinigung des geschützten Dokosapeptids an Sephadex LH 20

Fraktion I stellt das 22-iger Peptid dar. In Fraktion II finden sich die Rumpfpeptide.
Fraktion I liefert 35 mg Dokosapeptid.

Durch Reinigung des weiteren Materials erhält man letztendlich 70 mg reinweißes Dokosapeptid. Die Elutionsdiagramme der einzelnen Säulendurchläufe sind sehr unterschiedlich. Die weniger reinen Fraktionen müssen zum Teil mehrfach geschnitten werden.

Abb. 19 zeigt das Elutionsdiagramm einer nach der Kieselgelreinigung erhaltenen Rumpfpeptidfraktion. Bei der chromatographischen Reinigung an Sephadex LH 20 enthält der erste, schwach angetrennte Peak 22-iger Peptid.

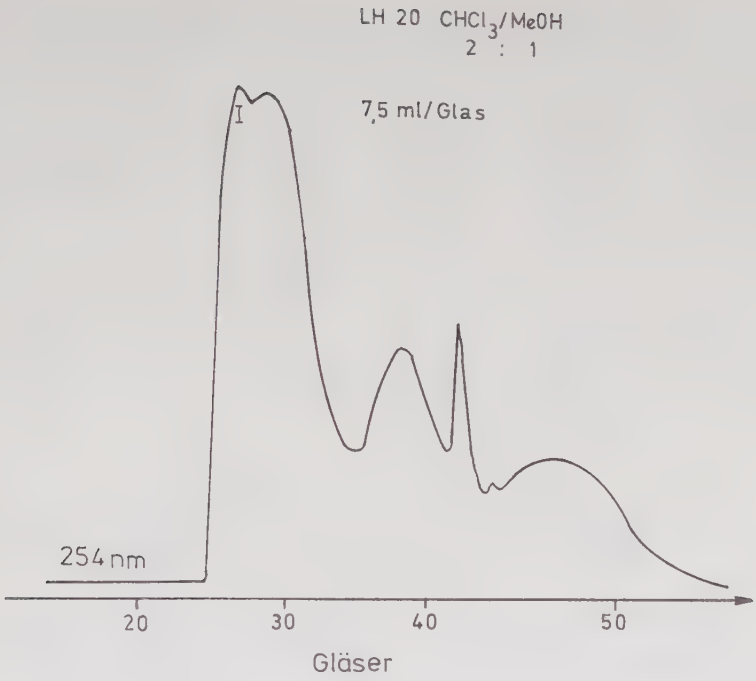


Abb. 19: Reinigung einer Rumpfpeptidfraktion an LH 20

Die Fraktionen I und II in Abb. 18 werden bezüglich ihrer Aminosäurezusammensetzung analysiert:

	I(a)	I(b)	II	Theorie
Ser	0.86	0.90	0.19	1
His	0.73	0.63	0.10	1
Leu	2.48	2.62	0.56	3
Val	1.47	1.65	0.32	2
Glu	1.82	2.05	0.57	2
Ala	1.72	1.72	1.03	2
Tyr	1.97	2.10	1.30	2
Cys^+	-	-	-	1

	I(a)	I(b)	II	Theorie
Gly	2.01	2.20	1.27	2
Arg	1.49	1.48	1.09	1
Phe	2.10	2.24	1.87	2
Thr	1.00	1.00	1.00	1
Pro	1.03	1.20	0.98	1
Lys	0.99	1.03	0.98	1

+ nicht bestimmt

I(a) = Dokosapeptid 24 Std. Hydrolyse
I(b) = Dokosapeptid 72 Std. Hydrolyse
II = Rumpfpeptidfraktion

6.5. Zusammenfassung der chemischen und physikalischen Daten

Ausbeute: 70 mg (10.3 %)

Elementaranalyse:

$C_{203}H_{250}N_{28}O_{42}BrCl_2S_3$ (3995.7)

	C	H	N	S
gef.:	59.37 %	6.06 %	8.72 %	2.48 %
ber.:	61.02 %	6.30 %	9.81 %	2.40 %

Reinheitskontrolle:

DC R_F = 0.89 (A)
= 0.61 (D)
Ninhydrin -
UV +
CT +
Pauly -

Drehwert: $[\alpha]_D^{23}$ = -15.6° (c = 1, DMF)

Razemisierungstest:

D-Anteile in %

	Ala	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Phe	Glu
gef.:	2.2	1.2	0.1	2.5	2.4	10.7	1.6	1.0
erwarteter Wert nach Lit. (120):	1.4	0.3	0.1	3.0	1.5	2.2	1.5	3.0

	Tyr	Lys	Arg	His
gef.:	1.3	0.6	2.2	4.6
erwarteter Wert nach Lit. (120):	1.4	2.4	1.2	3.4

7. Synthese der Rinderinsulin-B-Kette

7.1. Aufbau des Triakontapeptids

Das in Abschnitt 6. dargestellte polymergebundene Dokosapeptid wird durch stufenweisen Aufbau bis zur vollständigen Insulin-B-Kette weiterverarbeitet. In Tab. 10 ist der Syntheseverlauf und in Tab. 11 die dazugehörenden Analysenwerte abgebildet.

Jeder Kupplungsschritt wird zweimal durchgeführt und mit einem Acetylierungsschritt beendet. Mit Ausnahme des Histidins verlief laut Fluramtest jeder Kupplungsschritt problemlos. Bei der Histidinkupplung über das symmetrische Anhydrid zeigte der Fluramtest nach 1 Std. noch deutlich freie Aminofunktionen an. Zur Nachkupplung wurde die DCCI/HOBT-Methode eingesetzt.

Vorschrift:

Man setzt aus 2.7 g (5 mMol) BOC-His(BOC) x DCHA mit 5 ml 1 N Schwefelsäure die Carboxylgruppe frei. Das Ansäuern des Aminosäurederivats wird so vorgenommen, daß das BOC-

His(BOC)-OH sofort in Essigester aufgenommen wird. Die organische Phase wird säurefrei gewaschen und anschließend mit Natriumsulfat getrocknet. Am Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel entfernt, und das zurückbleibende Öl wird im Hochvakuum getrocknet. Dieses wird in 30 ml THF gelöst, mit 0.68 g HOBT versetzt und auf 0°C gekühlt. Man gibt 2.5 ml 2 M DCCI-Lösung (in Methylenchlorid) hinzu, hält 1 Std. bei 0°C, 1 Std. bei Raumtemperatur und filtriert den Ansatz zum gelösten Peptid-Polymer. Die berechnete Menge NMM wird zur Neutralisation zugesetzt. Nach 30 min. sind keine freien Aminogruppen mittels Fluram nachweisbar.

Die Aminosäurederivate BOC-Gln und BOC-Asn werden nach dieser Vorschrift unter Einsatz von HOBT gekuppelt.

Der Weiteraufbau wurde mit 16 g Dokosapeptidpolymer begonnen und auf der Triakontapeptidstufe mit 14 g beendet.

Tab. 10: Syntheseverlauf des Triakontapeptidpolymers

Dokosapeptid-polymer	Kupplung mit Derivat	Überschuß an Anhydrid	Lösungsmittel	
Gly	BOC-Gly	4	DMF/DMSO	1:1
Cys(SiP)	BOC-Cys(SiP)-OH	4	DMF/DMSO	1:2
Leu	BOC-Leu	4	DMF/DMSO	1:2
His	BOC-His(BOC)-OH	4+	DMF/DMSO	1:2
Gln	BOC-Gln	4/HOBT	DMF/DMSO	1:2
Asn	BOC-Asn	4/HOBT	DMF/DMSO	1:2
Val	BOC-Val	4	DMF/DMSO	1:2
BOC-Phe	BOC-Phe	4	DMSO	

Fortsetzung der Tabelle 10

Dokosapeptid-polymer	Kupplungs-dauer	Fällungen	BOC-Abspaltungen ml/Lösungsmittel	Reaktions-dauer
Gly	3.5 h	2	165 / TFA/CH_2Cl_2	25 min.
Cys(SiP)	3.5 h	2	165 / TFA/CH_2Cl_2	20 min.
Leu	3 h	2	165 / TFA/CH_2Cl_2	20 min.
His	3.5 h	2	165 / TFA/CH_2Cl_2	20 min.
Gln	4.5 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	20 min.
Asn	4 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	20 min.
Val	5 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	20 min.
BOC-Phe	5 h	3	165 / TFA/CH_2Cl_2	20 min.

+ Nachkupplung: 4/HOBT

7.2. Abspaltung des geschützten Peptids

3 g Peptidpolymer werden in trockenem DMSO analog 6.3. bestrahlt und aufgearbeitet. Die Bestrahlungszeit ist 29 Std. Bei den Methanoltrennungsgängen werden 5 % DMSO zugesetzt. Das anfänglich ziemlich schlecht in Methanol lösliche Photolyseprodukt (POE-Fraktion) ist bereits nach vier Trenngängen weitgehend vom abgespaltenen Peptid befreit. Dies erkennt man an der stetig besser werdenden Löslichkeit. Nach 6 Trenngängen ist die Polymerfraktion laut DC frei von abgespaltenem Peptid. Bezüglich seiner Löslichkeit hat die POE-Fraktion (1.77 g) wieder das erwartete Verhalten, also Löslichkeit in Wasser, Methanol und Methylenchlorid, angenommen. Die lyophilisierte Peptidfraktion dagegen ist in allen Lösungsmitteln, außer DMSO, extrem schlecht löslich.

Die POE-Fraktion wird einer Beladungsüberprüfung unterzogen, um dadurch den Abspaltungsgrad zu bestimmen. Die

Tab. 11: Aminosäurezusammensetzung der Polymerpeptidstufen

Peptid	Gly	Ala	Lys	Pro	Thr	Tyr	Phe	Arg	Glu	Cys[+]	Val[++]	Leu	His	Ser	Asp
23-er	3.46 (4)	1.65 (2)	1.00 (1)	1.02 (1)	0.94 (1)	1.82 (2)	2.00 (2)	1.45 (1)	1.37 (2)	- (1)	0.95 (2)	1.68 (3)	0.59 (1)	0.47 (1)	
24-er	nicht bestimmt														
25-er	3.45 (4)	1.85 (2)	1.00 (1)	1.14 (1)	0.93 (1)	1.79 (2)	2.01 (2)	1.50 (1)	1.39 (2)	- (2)	1.16 (2)	2.62 (4)	0.58 (1)	0.51 (1)	
26-er	3.08 (4)	1.79 (2)	1.00 (1)	1.20 (1)	0.86 (1)	1.75 (2)	1.81 (2)	1.52 (1)	1.57 (2)	- (2)	1.07 (2)	2.12 (4)	1.11 (2)	0.62 (1)	
27-er	3.05 (4)	1.61 (2)	1.00 (1)	+ (1)	0.93 (1)	1.76 (2)	1.93 (2)	1.48 (1)	2.32 (3)	- (2)	1.32 (2)	2.17 (4)	0.92 (2)	0.46 (1)	
28-er	3.12 (4)	1.74 (2)	1.00 (1)	1.16 (1)	0.92 (1)	1.65 (2)	1.73 (2)	1.26 (1)	1.68 (3)	- (2)	0.85 (2)	1.94 (4)	0.96 (2)	0.56 (1)	0.33 (1)
29-er	nicht bestimmt														
30-er	3.47 (4)	1.83 (2)	1.00 (1)	+ (1)	1.05 (1)	1.76 (2)	2.48 (3)	1.45 (1)	1.70 (3)	- (2)	1.06 (3)	1.97 (4)	0.98 (2)	0.53 (1)	0.25 (1)

[+] nicht bestimmt

[++] Hydrolyseresistenz valinhaltiger Fragmente bei kurzer Hydrolysezeit

Restbeladung beträgt etwa 20 %, das bedeutet, die Abspaltung durch Photolyse verläuft mit einer Ausbeute von ca. 80 %.

Aminosäureanalyse des Rohprodukts

	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Tyr
gef.:	0.21	1.00	0.57	1.87	3.05	1.65	1.16	2.42	1.94
Theorie:	1	1	1	3	3	2	3	4	2

	Phe	Lys	His	Arg	Pro
gef.:	2.82	1.04	1.02	1.45	1.12
Theorie:	3	1	2	1	1

Razemisierungstest:

D-Anteile in %

	Ala	Val	Thr	Pro	Leu	Ser	Asp	Phe	Glu
gef.:	3.4	1.6	0.1	2.0	1.3	7.4	11	1.5	4.6
erwarteter Wert nach Lit. (120):	1.3	0.3	0.1	3.0	1.5	2.2	5.0	1.5	3.0

	Tyr	Lys	Arg	His
gef.:	1.7	2.5	2.1	4.2
erwarteter Wert nach Lit. (120):	1.4	2.4	1.0	3.4

7.3. Schutzgruppenabspaltung

1.2 g des isolierten Peptidmaterials werden 45 min. mit 15 ml Fluorwasserstoff bei 0°C behandelt. Das nach Abblasen des HF verbleibende Öl wird im Vakuum über KOH getrocknet, in 40 ml Wasser aufgenommen und 5 mal mit Methylenchlorid extrahiert. Anschließend wird die wässrige Phase durch Filtration von unlöslichen Teilen befreit und lyophilisiert. Man erhält 585 mg Ausbeute. Durch die

darauffolgende Ionenaustauschchromatographie ließ sich keine reine Peptidfraktion erhalten.

8. Synthese des Insulinfragments B_{9-11} am löslichen Träger

8.1. BOC-Leu-Polymer

Aus 3.25 g (5.5 mMol) BOC-Leu-(4-carboxy-2-nitro)benzyl-esterdicyclohexylammoniumsalz werden mit 5.5 ml 1 N Schwefelsäure 2.05 g (5 mMol) BOC-Leu-(4-carboxy-2-nitro)benzyl-ester freigesetzt. Das gut getrocknete Öl wird in Methylen-chlorid gelöst, mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt und mit 1.25 ml 2 M DCCI-Lösung versetzt. Man rührt 30 min. bei 0°C, 30 min. bei Raumtemperatur und filtriert diese Kupplungskomponente anschließend zu 5 g (1.06 mMol Aminofunktionen) in Methylenchlorid gelöstem H-Gly-POE_{6000}. Als Base wird NMM zugesetzt. Die während der Reaktion entnommenen Proben zeigen für den Umsatztest mit Fluram nach 20 min. die quantitative Umsetzung an. Die Reaktion wird nach 3 Std. durch Ausfällen mit Ether beendet. Durch zweimaliges Umfällen aus Methylenchlorid/Ether lassen sich sämtliche niedermolekulare Anteile entfernen. Eine Aminosäureanalyse beweist die 100 %ige Kupplung mit der Trägersubstanz.

8.2. Kupplung mit BOC-His(Trt)-OH

5 g (0.93 mMol Aminofunktionen) BOC-Leu-Polymer werden mit 100 ml 1.2 N HCl/AcOH zur Schutzgruppenabspaltung behandelt. Die Aufarbeitung findet unter Standardbedingungen statt. 2.98 g (6 mMol) BOC-His(Trt)-OH werden in 40 ml CH_2Cl_2 gelöst und bei 0°C mit 1.5 ml 2 M DCCI-Lösung versetzt.

Der Ansatz wird 30 min. im Eisbad und 30 min. bei Raumtemperatur gerührt. Die Kupplungskomponente wird zu dem in Methylenchlorid gelösten H-Leu-Polymer filtriert. Zur Neutralisation kommt NMM zum Einsatz. Der quantitative Umsatz kann durch Fluram bereits nach 8 min. festgestellt werden. Der Ansatz wird 3 Std. gerührt und dann dreimal aus Methylenchlorid/Ether umgefällt.

8.3. Kupplung mit BOC-Ser(Bzl)-OH

4.5 g (0.75 mMol) BOC-His(Trt)-Leu-Polymer werden zur Schutzgruppenabspaltung in 10 ml Anisol und 100 ml 1.2 N HCl/AcOH gelöst. Man rührt 30 min., wobei keine Verfärbung der Lösung auftritt. Das Abspaltungsreagens wird am Rotationsverdampfer entfernt und das zurückbleibende Öl wird zweimal aus Methylenchlorid/Ether umgefällt.

1.8 g (6 mMol) BOC-Ser(Bzl)-OH werden in 30 ml Methylenchlorid mit 3 ml 1 M DCCI-Lösung zum symmetrischen Anhydrid umgesetzt. Man saugt diese Lösung über eine Glasfilterfritte G-3 zum gelösten Peptidpolymer und gibt NMM hinzu. Der Fluramtest zeigt nach 8 min. den quantitativen Umsatz an. Nach 3 Std. wird mit Ether ausgefällt und das Polymer durch zweimaliges Umfällen aus Methylenchlorid/Ether von niedermolekularen Anteilen befreit.
Ausbeute: 3.8 g (= 0.6 mMol Peptidgehalt)

Aminosäureanalyse:

	Ser	His	Leu
gef.:	1.02	1.00	0.96

8.4. Photolyse des Tripeptidpolymers

2.0 g (0.316 mMol) Peptidpolymer werden in Methanol nach Vorschrift 4.3. bestrahlt. Die Bestrahlungszeit beträgt 22 Std. Das Peptid wird durch eine einmalige Fällung aus Methanol abgetrennt.
Ausbeute: 268 mg (Peptid und sehr wenig POE)

Die Abspaltung vom Polymer ist laut ASA quantitativ.

Dünnschichtchromatographische Untersuchung

Das roh abgetrennte Peptid zeigt laut DC folgende Zusammensetzung:

R_F	(A)	I	0.84
		II	0.51
		III	0.0

Interpretation: I stimmt exakt mit dem klassisch hergestellten Tripeptid überein; Pauly negativ

II tritt beim klassisch hergestellten Tripeptid nur in Spuren auf; bei der Liquid-Phase-Methode zu rund 20 %.
Pauly positiv; Tritylschutzgruppe abgespalten

III Reste von POE und Peptid-POE

Photolyse des klassisch hergestellten Tripeptids

200 mg BOC-Ser(Bzl)-His(Trt)-Leu-OH werden analog 8.4. 22 Std. in Methanol bestrahlt. Nach Rückgewinnung des Peptids wird eine Aminosäureanalyse durchgeführt.

	Ser	His	Leu
gef.:	0.96	1.00	0.98

DC

Bei R_F = 0.51 (A) tritt ein Pauly positiver Fleck auf. Die Konzentration ist gemäß Farbreaktion geringer als bei dem nach Liquid-Phase-Methode gewonnenen Produkt.

III. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit werden die Synthesen von Insulinfragmenten an Poly(oxyethylen) unter Verwendung photolabiler Ankerverbindungen beschrieben.

Der Fixierung der C-terminalen Aminosäure an den polymeren Träger wurde dabei große Aufmerksamkeit gewidmet. Die stufenweisen Aufbaureaktionen über polymergebundene Brombenzylfunktionen und Cäsiumsalze der geschützten Aminosäuren erbrachten hierbei nicht die gewünschte Beladungsgrade. Durch die Synthesen der BOC-Aminosäure - (4-carboxy-2-nitro)benzylester und deren Umsatz mit der Trägersubstanz Gly-POE wurde ein großer Fortschritt erzielt. Durch die Darstellung dieser Verbindungsklasse mit verschiedenen Aminosäuren und der Einsatz an mehreren polymeren Trägern ließ sich deren Einsatzmöglichkeit demonstrieren.

Es wird die Synthese der geschützten C-terminalen Nona-, Undeka- und Dokosapeptide der Rinderinsulin-B-Kette beschrieben. Der Aufbau der geschützten Peptidpolymere konnte unter Standardbedingungen in bereits erprobten Lösungsmitteln durchgeführt werden.

Die eingesetzten Aminosäurederivate ließen sich ohne nennenswerte Probleme in Form der symmetrischen Anhydride umsetzen. Als problematisch erwies sich lediglich die Kupplung von BOC-Arg(Mbs)-OH. Beim Aufbau des Dokosapeptids konnte eine Fragmentkupplung des Tripeptids mit dem Nonadekapeptidpolymer wirksam durchgeführt werden.

Durch Photolyse in den Lösungsmitteln Methanol und Dimethylsulfoxid ließen sich die Peptide in geschützter Form in guten Ausbeuten abspalten. Die eingesetzten Schutzgruppen wurden unter diesen Bedingungen nicht mitabgespalten. Eine Razemisierung der Aminosäuren wurde nicht

beobachtet. Im Falle des Nona- und des Undekapeptids wurde mit Hilfe von Fluorwasserstoff eine Schutzgruppenabspaltung durchgeführt. Die freien Peptide wurden durch Ionenaustauschchromatographie in reiner Form gewonnen. Die Ausbeuten bei der Abspaltung der Drittfunktionsschutzgruppen und bei der abschließenden Reinigung sind dabei jedoch noch zu verbessern. Besonders traten diese Probleme bei der Isolierung des freien 22-iger Peptids hervor.

Die Synthese der vollständigen Insulin-B-Kette wurde durch stufenweise Kupplungsreaktionen weitergeführt. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Umsetzung des Fragments Asn-Gln-His konnte eine befriedigende Reinheit des Peptidpolymers nicht erreicht werden. Die photolytische Abspaltung des Triakontapeptids verlief jedoch zufriedenstellend. Eine anschließende Reinigung des Rohmaterials ließ sich wegen der starken Verunreinigung mit Rumpfpeptiden nicht erreichen, zumal die geschützte Insulin-B-Kette aufgrund ihrer Schwerlöslichkeit nicht weiter gereinigt werden konnte.

Bei einer Wiederholung dieser Synthese sollte darauf geachtet werden, daß Arginin quantitativ eingebaut wird. Dies sollte durch den Einsatz der Tos-Schutzgruppe an der Guanidinogruppe erreicht werden. Desweiteren muß auf die Einbaureaktionen von Asn, Gln und His besonders geachtet werden.

IV. LITERATURVERZEICHNIS

1) E. Fischer und E. Fourneau, Chem. Ber. 34, 2868 (1901).
2) M. Bergmann und L. Zervas, Chem. Ber. 65, 1192 (1932).
3) E. Wünsch, Synthese von Peptiden, in Houben-Weyl-Müller, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1974).
4) E. Schröder und K. Lübke, "The Peptides", Academic Press New York und London (1965).
5) H.-D. Jakubke und H. Jeschkeit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine" Akademie-Verlag Berlin (1982).
6) M. Bodanszky und V.J. du Vigneaud, J. Amer. Chem. Soc. 81, 2504 (1959).
7) M. Bodanszky, Y.S. Klausner und M.A. Ondetti, "Peptide Synthesis", Wiley, second ed. New York (1976).
8) I.C. Sheehan und G.P. Hess, J. Amer. Chem. Soc. 77, 1067 (1955).
9) R.A. Boissonas, Helv. Chim. Acta 34, 874 (1951).
10) T. Wieland, W. Kern und R. Sehring, Liebigs Ann. Chem. 569, 117 (1950).
11) M.A. Tilak, Tetrahedron Letters 11, 849 (1970).
12) N.F. Albertson, Org. Reactions 12, 157 (1962).
13) T. Wieland und H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 (1951).
14) W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788 (1970).
15) T. Curtius, Ber. dtsch. Chem. Ges. 35, 3226 (1902).
16) F.M. Finn und K. Hofmann in H. Neurath und R.L. Hill: "The Peptides", Vol. II, Academic Press, New York (1976).
17) R. Schwyzer und P. Sieber, Helv. Chim. Acta 49, 134 (1966).
18) M. Bodanszky und N.J. Williams, J. Amer. Chem. Soc. 89, 685 (1967).
19) M. Bodanzsky, M.A. Ondetti, S.D. Levine und N.J. Williams, J. Amer. Chem. Soc. 89, 6753 (1967).

20) M. Fridkin, A. Patchornik und E. Katchalski, J. Amer. Chem. Soc. 88, 3164 (1966).
21) M. Fridkin, A. Patchornik und E. Katchalski, J. Amer. Chem. Soc. 90, 2953 (1968).
22) M. Fridkin, A. Patchornik und E. Katchalski, Biochemistry 11, 466 (1972).
23) R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2149 (1963).
24) W.S. Hancock und G.R. Marshall, J. Amer. Chem. Soc. 93, 1799 (1971).
25) W.S. Hancock und G.R. Marschall, J. Biol. Chem. 247, 6224 (1972).
26) A. Marglin und R.B. Merrifield, Ann. Rev. Biochem. 39, 841 (1970).
27) D.H. Rich und S.K. Gurwara, J. Amer. Chem. Soc. 97, 1575 (1975).
28) S.S. Wang, J. Org. Chem. 41, 3258 (1976).
29) H. Eckstein, Dissertation Universität Tübingen (1970).
30) E. Bayer, H. Eckstein, K. Hägele, W.A. König, W. Brüning und H. Hagenmaier, J. Amer. Chem. Soc. 92, 1735 (1970).
31) A. Marglin und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 88, 5051 (1966).
32) B. Gutte und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 91, 501 (1969).
33) E. Bayer, G. Jung und H. Hagenmaier, Tetrahedron 24, 4853 (1968).
34) B. Hemmasi und E. Bayer, Int. J. Peptide Protein Res. 9, 63 (1977).
35) C.H. Li und D. Yamashiro, J. Amer. Chem. Soc. 92, 7608 (1970).
36) R.B. Merrifield, Pure Appl. Chem. 50, 643 (1978).
37) R.L. Letsinger und M.J. Kornet, J. Amer. Chem. Soc. 85, 3045 (1963).
38) M.M. Shemyakin, Y.A. Ovchinnikov, A.A. Kiryushkin und I.V. Kozhevnikova, Tetrahedron Letters 27, 2323 (1965).

39) R.H. Andreatta und H. Rink, Helv. Chim. Acta 56, 1205 (1973).
40) E. Bayer, H. Hagenmaier und M. Mutter, Angew. Chem. 83, 883 (1971).
41) E. Bayer und M. Mutter, Nature 237, 512 (1972).
42) E. Bayer und M. Mutter, Angew. Chem. 86, 101 (1974).
43) W. Stein, Dissertation Universität Tübingen (1976).
44) W. Woiwode, Dissertation Universität Tübingen (1977).
45) H. Albrecht, Dissertation Universität Tübingen (1978).
46) W. Schoknecht, Dissertation Universität Tübingen (1979).
47) R. Eberle, Dissertation Universität Tübingen (1979).
48) E. Bayer, M. Mutter, R. Uhmann, J. Polster und H. Mauser, J. Amer. Chem. Soc. 96, 7333 (1974).
49) M. Weigele, S.L. DeBernardo, J.-P. Tengi und W. Leimgruber, J. Amer. Chem. Soc. 94, 5927 (1972).
50) A. Felix und M.H. Jiminez, J. Chromat. 89, 361 (1974).
51) E. Bayer, G. Holzer und M. Mutter in R. Walter und J. Meienhofer: "Peptides: Chemistry, Structure, Bonding", Seite 425, Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor Michigan (1975).
52) U. Heitmann, Dissertation Universität Tübingen (1978).
53) B. Kluth, Dissertation Universität Tübingen (1981).
54) B. Hemmasi, persönliche Mitteilung.
55) I. Gatfield, Dissertation Universität Tübingen (1975).
56) B. Hemmasi, W. Woiwode und E. Bayer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 1775 (1979).
57) F.-S. Tjoeng, W. Staines, S. St.-Pierre und R.S. Hodges, Biochim. Biophys. Acta 490, 489 (1977).
58) F.-S. Tjoeng, E.K. Tong und R.S. Hodges, J. Org. Chem. 43, 4190 (1978).
59) W. Stüber, B. Hemmasi und E. Bayer, Int. J. Peptide Protein Res., im Druck.
60) F.-S. Tjoeng und G.A. Heavner, Tetrahedron Letters 23, 4439 (1982).

61) F.-S. Tjoeng und G.A. Heavner, J. Org. Chem. 48, 355 (1983).
62) M. Mutter, Dissertation Universität Tübingen (1972).
63) B.F. Gisin, Helv. Chim. Acta 56, 1476 (1973).
64) A. Marglin, Tetrahedron Letters 33, 3145 (1971).
65) W. Stüber, Diplomarbeit Universität Tübingen (1981).
66) B. Hemmasi, W. Stüber und E. Bayer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 701 (1982).
67) H. Klostermeyer und R.E. Humbel, Angew. Chem. 78, 871 (1966).
68) H. Zahn, Naturwiss. 54, 396 (1967).
69) K. Lübke und H. Klostermeyer, Adv. Enzymol. 35, 445 (1970).
70) R. Geiger, Chemiker-Ztg. 100, 111 (1976).
71) D.F. Steiner, D. Cunningham, L. Spiegelman und B. Aten, Science 157, 697 (1967).
72) R. Knorr, W. Danho, E.E. Büllesbach, H.-G. Gattner, H. Zahn, G.L. King und C.R. Kahn, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1449 (1982).
73) Y.-C. Du et al., Sci. Sin. 10, 84 (1961).
74) J. Meienhofer, E. Schnabel, H. Bremer, O. Brinkhoff, R. Zabel, W. Sroka, H. Klostermeyer, D. Brandenburg, T. Okuda und H. Zahn, Z. Naturforschg. 18b, 1120 (1963).
75) P.G. Katsoyannis, K. Fukuda, A. Tometsko, K. Suzuki und M. Tilak, J. Amer. Chem. Soc. 86, 930 (1964).
76) Y.-T. Kung et al., Sci Sin. 14, 1710 (1965).
77) Y. Yanaihara et al. in T. Shiba (Hrsg.) (1978): "Peptide Chemistry 1977", Proc. 15th Symposium on Peptide Chemistry, Osaka, 1977, Protein Research Foundation, Osaka.
78) J. Föhles et al., 15th Europ. Peptidsymposium, Gdansk, Abstracts, S. 65 (1978).
79) P. Sieber, B. Kamber, A. Hartmann, A. Johl, B. Riniker und W. Rittel, Helv. Chim. Acta 57, 2617 (1974).

80) C. Birr, R. Pipkorn, H.-G. Gattner, R. Renner und H.U. Haering, Proc. Int. Insulin Symp., 2nd 1979, S. 51 (1980).

81) C. Voss und C. Birr, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 717 (1981).

82) M.J. Ross, National Institutes of Health Recombinant DNA Technical Bulletins 3, 1 (1980).

83) L. Villa-Komaroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3727 (1978).

84) D.Y. Goeddel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106 (1979).

85) E. Schnabel, Liebigs Ann. Chem. 702, 188 (1967).

86) J.M. Steward und J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis 1969, W.H. Freeman Co., San Francisco, Calif.

87) L. Moroder, A. Hallett, E. Wünsch, O. Keller und G. Wersin, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1651 (1976).

88) H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, J. Chromatogr. Sci. 15, 174 (1977).

89) W. Woiwode, H. Frank, G.J. Nicholson und E. Bayer, Chem. Ber. 111, 3711 (1978).

90) R. Häbich, persönliche Mitteilung.

91) M. Dengler, Dissertation in Vorbereitung.

92) H. Hellstern, persönliche Mitteilung.

93) U. Weber und P. Hartter, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1384 (1970).

94) G.W. Anderson und A.C. McGregor, J. Amer. Chem. Soc. 79, 6180 (1957).

95) A. Yavon und S.F. Schlossman, Biochemistry 7, 2673 (1968).

96) D. Yamashiro und C.H. Li, J. Amer. Chem. Soc. 95, 1310 (1973).

97) T. Mizoguchi, G. Levin, D.W. Woolley und J.M. Stewart, J. Org. Chem. 33, 903 (1968).

98) E. Wünsch und A. Zwick, Chem. Ber. 97, 2497 (1964).
99) St. Guttmann und R.A. Boissonas, Helv. Chim. Acta 41, 1852 (1958).
100) H. Rink und B. Riniker, Helv. Chim. Acta 57, 831 (1974).
101) G.C. Stelakatos, D.M. Theodoropoulos und L. Zervas, J. Amer. Chem. Soc. 81, 2884 (1959).
102) G. Losse und U. Krychowski, J. prakt. Chem. 312, 1097 (1970).
103) G. Losse, M. Mauck und H. Stange, Tetrahedron 33, 1813 (1977).
104) H.R. Bosshard, Helv. Chim. Acta 54, 951 (1971).
105) G. Losse, H. Stange, B. Schwenzer und W. Naumann, Tetrahedron 34, 2687 (1978).
106) G. Losse und K.-J. Schumacher, Tetrahedron 33, 1519 (1977).
107) H. Hagenmaier und H. Frank, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1973 (1972).
108) D. Yamashiro und C.H. Li, J. Org. Chem. 38, 591 (1973).
109) D. Yamashiro und C.H. Li, Int. J. Peptide Protein Res. 4, 181 (1972).
110) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada und H. Sugihara, Bull. Chem. Soc. Jap. 40, 2164 (1967).
111) B.W. Erickson und R.B. Merrifield, 3rd American Peptide Sym., Boston, Mass. Juni 1972.
112) B.W. Erickson und R.B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 95, 3750 (1973).
113) O. Nishimura und M. Fujino, Chem. Pharm. Bull. 24, 1568 (1976).
114) A. Patchornik, B. Amit und R.B. Woodward, J. Amer. Chem. Soc. 92, 6333 (1970).
115) R. Colombo, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1393 (1981).
116) V.N.R. Pillai, M. Mutter und E. Bayer, Tetrahedron Letters 36, 3409 (1979).

117) V.N.R. Pillai, M. Mutter, E. Bayer und I. Gatfield, J. Org. Chem. 45(26), 5364 (1980).
118) V.N.R. Pillai, Synthesis (Review), 1 (1980).
119) J. Lenard und A.B. Robinson, J. Amer. Chem. Soc. 89, 181 (1967).
120) H. Frank, W. Woiwode, G.J. Nicholson und E. Bayer, Liebigs Ann. Chem. 354 (1981).
121) Biochemistry 14, 449 (1972).
122) J. Biol. Chem. 247, 977 (1972).
123) D.H. Spackman, W.H. Stein und S. Moore, Anal. Chem. 30, 1185 (1958).
124) D.J. McCaldin, Chem. Rev. 60, 39 (1960).
125) R.A. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner, Helv. Chim. Acta 44, 2022 (1961).
126) F. Reindel und W. Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954).
127) G. Pataki, J. Chromat. Sci. 12, 541 (1963).
128) K. Bürger, Z. Anal. Chem. 196, 251 (1963).
129) K. Bürger, Z. Anal. Chem. 224, 421 (1967).
130) H. Jatzkewitz, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 292, 99 (1953).
131) M.R. Grimmett und E.L. Richards, J. Chromat. 20, 171 (1965).
132) L.A. Carpino, J. Amer. Chem. Soc. 79, 4430 (1957).
133) L.A. Carpino, C.A. Giza und B.A. Carpino, J. Amer. Chem. Soc. 81, 955 (1959).
134) E. Schröder und E. Klieger, Liebigs Ann. Chem. 673, 196 (1963).
135) D. Yamashiro, J. Blake und C.H. Li, J. Amer. Chem. Soc. 94, 2855 (1972).
136) N.C. Davis, J. Biol. Chem. 223, 941 (1956).
137) K. Hoffmann, W. Haas, M.J. Smithers und G.D. Zanetti, J. Amer. Chem. Soc. 87, 631 (1965).
138) B.O. Handford, T.A. Hylton, K.-T. Wang und B. Weinstein, J. Org. Chem. 33, 4251 (1968).
139) R.A. Boissonas, S. Guttmann, R.L. Huguenin, P.-A. Jaquenod und E. Sandrin, Helv. Chim. Acta 41, 1867 (1958).

140) Y. Kashman und J.A. Edwards, J. Org. Chem. 43, 1538 (1978).

141) R. Roeske, Chem. and Ind. 1121 (1959).

142) H.-P. Seelmann-Eggebert, Dissertation in Vorbereitung.

143) B. Schartmann, H.-G. Gattner, W. Danho und H. Zahn, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 179 (1983).

Meine akademischen Lehrer waren Frau Professor S. Kemmler-Sack und die Herren Professoren und Dozenten

E. Bayer, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, H. Krüger, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Mauser, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rundel, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil.

LEBENSLAUF

Werner Stüber

13.09.1954	geboren in Heidenheim
1961 - 1965	Grundschule Heidenheim
1965 - 1973	Max-Planck-Gymnasium Heidenheim
Juni 1973	Abitur
Okt. 1973 - Juni 1975	Wehrdienst
Okt. 1975	Beginn des Chemiestudiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
April 1978	Vordiplom
Sept. 1980	Mündliche Hauptdiplomprüfung
Okt. 1980 - April 1981	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Ernst Bayer: "Aufbau eines Tripeptids am löslichen Träger unter Einführung von BOC-Aminosäure-(4-carboxy-2-nitro)benzyl-estern"
April 1981	Diplom
Mai 1981 - Mai 1983	Experimenteller Teil der Dissertation: "Synthese von Rinderinsulinfragmenten nach der Liquid-Phase-Methode unter Einsatz photolabiler Ankerverbindungen" unter der Leitung von Prof. Dr. Ernst Bayer, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen
November 1980	Heirat mit Monika, geb. Link